



Universidad  
Católica de  
Valencia  
San Vicente Mártir

TFG

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**GRADO EN  
BIOTECNOLOGÍA**

# Evaluación de los miARN como marcadores de ferroptosis en modelo celular de Ataxia de Friedreich

Alumno: Jaime Navarro Pérez

Tutor UCV: Antonio Pineda Lucena

Tutores externos: José Santiago Ibáñez Cabellos y Marta Seco Cervera

Curso académico: 2019-20

**INCLIVA | VLC**  
Instituto de Investigación Sanitaria



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA



**Facultad de Veterinaria  
y Ciencias Experimentales**  
Universidad Católica de Valencia  
San Vicente Mártir





Este trabajo se ha llevado a cabo en el grupo U733 del CIBERER de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Parte de los resultados obtenidos en el curso de este TFG fueron incluidos en el póster titulado "*Identificación de microARN en modelos animales de ataxia de Friedreich*" Jose Santiago Ibañez-Cabellos, Marta Seco-Cervera, Dayme González-Rodríguez, Marina González-Hurtado, Jaime Navarro-Pérez, Pilar González-Cabo, Federico V. Pallardó Calatayud, Jose Luis García-Giménez, que fue presentado en la Jornada del Día Mundial de las Enfermedades Raras 2020 realizada el día 28 de febrero en Castellón.



## Agradecimientos

---

*Me gustaría dedicar un pequeño apartado a todas aquellas personas que han hecho posible este trabajo, ya que este no habría sido posible sin su ayuda y dedicación. Por ello me gustaría agradecer a todos ellos:*

*Al Dr. Federico V. Pallardó Calatayud por darme la gran oportunidad de realizar las prácticas externas en sus instalaciones, así como, por sus consejos, correcciones y ayuda a la hora de realizar este trabajo.*

*A mi tutor de la UCV, el Dr. Antonio Pineda Lucena, por despertar en mí un espíritu competitivo en sus clases de enzimología, siempre desde el respeto y el buen compañerismo. Y ayudarme con las correcciones y consejos en la elaboración de este trabajo.*

*A mis tutores externos, el Dr. José Santiago Ibáñez Cabellos y la Dra. Marta Seco Cervera, por su profunda dedicación, sus detalladas correcciones, su apoyo y consejos en los momentos de frustración; y por descubrirme el mundo apasionante de la investigación y sus complejidades.*

*A todos los compañeros del laboratorio CIBERER U733, por amenizar mi estancia de prácticas y su buena compañía.*

*A mi familia y a mi novia, por apoyarme de forma incondicional y aguantar mis agobios o mis quejas. Sois el motor de mi vida.*

*A mis amigos y compañeros del grado, por ayudarme cuando tenía cualquier duda de carácter académico o burocrático; y por su apoyo y comprensión.*



## Índice

---

<b>Resumen .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>III</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>V</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1. Enfermedades raras.....	1
1.2. La ataxia de Friedreich.....	1
1.2.1. Clínica de la enfermedad.....	2
1.2.2. Estructura y regulación del gen <i>FXN</i> .....	3
1.2.3. La proteína frataxina.....	5
1.2.3.1. Estructura y procesado de frataxina.....	5
1.2.3.2. Función de la proteína frataxina.....	6
1.2.4. Patología molecular.....	7
1.3. Los microARN y la FRDA.....	9
1.4. Ferroptosis en la ataxia de Friedreich .....	10
1.5. Hipótesis planteada.....	15
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>17</b>
<b>3. Materiales y Métodos .....</b>	<b>19</b>
3.1. Cultivos celulares.....	19
3.2. Extracción de los miARN y del ARNm .....	20
3.3. Análisis por RT-qPCR de los miARN .....	21
3.4. Análisis de rutas reguladas por miARN.....	23
3.5. Análisis por RT-qPCR del ARNm.....	24
3.6. Extracción de proteínas .....	25
3.7. Cuantificación de las proteínas por el método Bradford.....	25
3.8. Análisis de la expresión de proteínas por Western-Blot.....	26
3.9. Análisis de la densitometría .....	28

3.10. Determinación del cociente glutatión oxidado (GSSG)/glutatión reducido (GSH).....	28
3.11. Análisis estadísticos.....	29
<b>4. Resultados.....</b>	<b>31</b>
4.1. La reducción de los niveles de FXN produce cambios en el perfil de expresión de los miARN .....	31
4.2. El perfil de los miARN obtenidos tiene como diana las rutas del metabolismo de FoxO, ácidos grasos y del estrés oxidativo .....	33
4.3. Los niveles de Atrogina-1 se ven elevados en los modelos deficientes en frataxina.....	35
4.4. La proteína Glutatión peroxidasa 4 se encuentra alterada en los modelos deficientes en frataxina.....	37
4.5. Los modelos deficientes en frataxina presentan mayores niveles de glutatión oxidado .....	39
<b>5. Discusión .....</b>	<b>43</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>51</b>
<b>7. Limitaciones .....</b>	<b>53</b>
<b>8. Líneas futuras.....</b>	<b>55</b>
<b>9. Bibliografía .....</b>	<b>57</b>

## Índice de Figuras

---

<b>Figura 1.</b> Estructura y elementos reguladores del gen <i>FXN</i> .....	4
<b>Figura 2.</b> Estructura 3D y procesamiento de la frataxina.....	5
<b>Figura 3.</b> Esquema de la maquinaria de biosíntesis de centros Fe-S mitocondrial.....	7
<b>Figura 4.</b> Ecuación de neutralización del oxígeno reactivo por enzimas antioxidantes (A) y la reacción de Fenton (B).....	8
<b>Figura 5.</b> Biosíntesis de los miARN .....	9
<b>Figura 6.</b> Principales mecanismos de la ferroptosis .....	12
<b>Figura 7.</b> Validación de los niveles de expresión relativa de los miARN obtenidos en el análisis de secuenciación de los ARN pequeños .....	32
<b>Figura 8.</b> Representación gráfica de los diferentes genes diana y de las rutas reguladas por los miARN obtenidos con expresión diferencial.....	35
<b>Figura 9.</b> Expresión relativa del gen <i>FBXO32</i> .....	36
<b>Figura 10.</b> Niveles de la proteína <i>FBXO32</i> mediante análisis WB.....	37
<b>Figura 11.</b> Niveles de expresión relativa de los genes diana de los diferentes miARN.....	38
<b>Figura 12.</b> Niveles de las proteínas <i>ACSL4</i> y <i>GPX4</i> mediante análisis WB .....	39
<b>Figura 13.</b> Niveles de expresión relativa de los genes diana de los miARN, implicados en la síntesis del GSH.....	40
<b>Figura 14.</b> Niveles de GSH.....	41

## Índice de Tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Rutas moleculares KEGG obtenidas que son reguladas por los miARN validados en los modelos celulares deficientes en frataxina .....	33
<b>Tabla 2.</b> Procesos biológicos GO obtenidos que son regulados por los miARN validados en los modelos celulares deficientes en frataxina .....	34



## Resumen

---

La ataxia de Friedreich (FRDA; OMIM 229300) es una enfermedad neurodegenerativa rara autosómica recesiva, caracterizada por la pérdida de los nervios sensitivos periféricos y del cerebelo, que generan alteración de la marcha, el lenguaje y los reflejos de los miembros inferiores. Además, algunos pacientes presentan otras enfermedades concomitantes como son la diabetes tipo 2, la escoliosis y cardiomiopatía hipertrófica. En la mayoría de los casos, la enfermedad está causada por el aumento en las expansiones GAA en el primer intrón del gen *FXN*, provocando una disminución de la proteína codificada, la frataxina. Debido a la heterogeneidad fenotípica observada en estos pacientes y la ausencia de marcadores de pronóstico y seguimiento fiables, es más que evidente la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores. En este trabajo, se pretende validar y determinar, en un modelo neuronal de FRDA, los miARN como biomarcadores de ferroptosis, un nuevo tipo de muerte celular relacionada con la acumulación de hierro y la peroxidación de lípidos. Previamente, el grupo de investigación secuenció e identificó un perfil diferencial de expresión de miARN en un modelo de deficiencia de frataxina (pLKO-FXN) en células SH-SY5Y. En este mismo modelo, se validaron estos miARN y se identificó al miR-15a-3p, miR-106b-5p, miR-106b-3p y miR-10b-5p con diferencias significativas en los niveles de expresión en comparación con controles sanos. Tras el análisis bioinformático de las rutas reguladas, se validaron algunas dianas de los miARN, observándose un aumento significativo de atrogina-1 (FBXO32) y GPX4. Esta última es diana del miR-15a-3p, cuya expresión se observó disminuida, y por tanto podría ser un posible biomarcador de ferroptosis en FRDA. Finalmente, se determinó el ratio de GSSG/GSH y las enzimas de síntesis del GSH, observando un aumento del GSSG indicativo de presencia de estrés oxidativo. En conclusión, los miARN podrían ser biomarcadores en la fisiopatología de la enfermedad.

## Palabras clave

estrés oxidativo, miARN, ferroptosis, ataxia de Friedreich, enfermedad rara, neuropatía



## Abstract

---

Friedreich's ataxia (FRDA; OMIM 229300) is a rare autosomal recessive neurodegenerative disease characterized by the loss of peripheral sensory nerves and the cerebellum, which leads to alterations in gait, language, and reflexes in the lower limbs. Moreover, some patients suffer other concomitant diseases such as type 2 diabetes, scoliosis, and hypertrophic cardiomyopathy. In most cases, the disease is caused by the increase in GAA expansions in the first intron of the *FXN* gene, causing a decrease in the encoded protein, frataxin. Due to the phenotypic heterogeneity observed in these patients and the absence of reliable prognostic and follow-up markers, it is more than evident the need to find new biomarkers. In this work, the aim is to validate and determine, in a neural FRDA model, miRNAs as biomarkers of ferroptosis, a new type of cell death related to iron absorption and lipid peroxidation. Previously, the research group sequenced and identified a differential miRNA expression profile in a frataxin deficiency model (pLKO-FXN) in SH-SY5Y cells. In this same model, these miRNAs were validated and miR-15a-3p, miR-106b-5p, miR-106b-3p and miR-10b-5p were identified with differences in expression levels compared to healthy controls. After bioinformatic analysis of the regulated pathways, some targets of the miRNAs were validated, observing a significant increase in atrogin-1 (FBXO32) and GPX4. The last one mentioned is a target of miR-15a-3p, whose expression has been shown decreased, and therefore could be a possible biomarker of ferroptosis in FRDA. Finally, the ratio of GSSG/GSH and GSH synthesis enzymes was determined, observing an increase in GSSG indicative of the presence of oxidative stress. In conclusion, miRNAs could be biomarkers in the pathophysiology of the disease.

## Keywords

oxidative stress, miRNA, ferroptosis, Friedreich's ataxia, rare disease, neuropathy



## Abreviaturas

---

- **ACSL4:** miembro 4 de la familia de cadena larga de acil-CoA sintetasa
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **ADNc:** ADN complementario
- **AGPI:** ácido graso poliinsaturado
- **ARN:** ácido ribonucleico
- **ARNm:** ARN mensajero
- **BSA:** albúmina sérica bovina
- **DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- **ERO:** especies reactivas del oxígeno
- **FBXO32:** gen codificante de atrogina-1
- **FOXO3A:** gen codificante del factor de transcripción FOXO3A
- **FRDA:** ataxia de Friedreich
- **FXN:** gen codificante de la frataxina
- **GPX4:** gen codificante de la glutatión peroxidasa 4
- **GSH:** glutatión
- **GSSG:** disulfuro de glutatión
- **miARN:** micro ARN
- **NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- **NFAT:** factor nuclear de las células T activadas
- **PBS:** tampón fosfato salino
- **PTEN:** fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
- **RT-qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
- **SDS:** dodecilsulfato sódico



# 1. Introducción

---

## 1.1 Enfermedades raras

Una enfermedad rara, en Europa, es aquella que afecta a menos de 1 persona por cada 2000. El 80% de dichas enfermedades diagnosticadas, tiene un origen genético, mientras que otras aparecen como resultado de una infección vírica o bacteriana, reacciones alérgicas o causas ambientales; otras muchas enfermedades raras siguen sin tener una causa definida. Estas enfermedades son en su mayoría graves, de carácter crónico y progresivo. Muchas de ellas pueden presentar síntomas en el nacimiento o durante la infancia, sin embargo, más del 50% de estas aparecen durante la edad adulta ("Orphanet: About rare diseases", 2020).

Hasta la fecha, se han descrito y caracterizado alrededor de 6000-7000 enfermedades raras, las cuales presentan una gran diversidad, no solo entre las distintas enfermedades sino, también entre pacientes afectados por una misma enfermedad. Esta elevada diversidad, supone una de las principales limitaciones asociadas al diagnóstico, debido a que no siempre la sintomatología permite el diagnóstico de forma directa ("Orphanet: About rare diseases", 2020).

Para muchas de estas enfermedades no existe una cura, pero el tratamiento y la atención médica adecuada pueden mejorar la calidad de vida de los pacientes, así como extender su esperanza y calidad de vida. Por lo que es absolutamente necesario, el continuar y aumentar los esfuerzos en los campos de la investigación ("Orphanet: About rare diseases", 2020).

## 1.2 La ataxia de Friedreich

La ataxia de Friedreich (FRDA; OMIM, *Herencia mendeliana en el hombre en línea*, #229300; ORPHA:95) es una enfermedad neurodegenerativa rara autosómica recesiva que afecta principalmente al sistema nervioso central y periférico, además de al esqueleto, al corazón o al sistema endocrino (Bidichandani y Delatycki, 1998). Se trata de la forma de ataxia hereditaria más común a nivel mundial, afectando alrededor de 2-5 personas por cada 100.000. En la Comunidad Valenciana, concretamente, la

prevalencia es de 3-4 casos cada 100.000 habitantes (López-Arlandis, Vílchez, Palau y Sevilla, 1995).

La enfermedad fue descrita, por primera vez, por Nikolaus Friedreich en 1863 a partir de pacientes que presentaban problemas de coordinación, debilidad en las piernas, dificultades en la articulación del habla (disartria), movimientos rápidos e incontrolados de los ojos (nistagmo), pérdida sensorial, escoliosis y deformidades en los pies (Schulz y Pandolfo, 2013).

En 1988, Chamberlain *et al.* consiguieron localizar en el cromosoma 9 la mutación responsable de la enfermedad (Chamberlain *et al.*, 1988). Posteriormente, Campuzano *et al.* lograron identificar el gen causal *FXN* dentro de la región cromosómica 9q13 (Campuzano *et al.*, 1996), el cual codifica para la proteína frataxina. Desde entonces, comenzó la labor que continúa hoy en día de caracterización de dicha proteína y su papel en la FRDA (Abrahão *et al.*, 2015). La principal causa de la FRDA es una reducción en los niveles de frataxina, que en la mayoría de los casos se debe a la presencia, en homocigosis, de una expansión de las repeticiones del triplete GAA localizadas en el intrón 1 del gen *FXN* (Campuzano *et al.*, 1996).

### **1.2.1 Clínica de la enfermedad**

En la ataxia de Friedreich, se observan manifestaciones neurológicas consistentes en una ataxia progresiva, que puede iniciarse desde la infancia hasta la etapa adulta temprana, comenzando con problemas de equilibrio al andar, seguidos de disartria y ataxia de los miembros superiores. La edad media de aparición de los primeros síntomas se sitúa entre los 10 y los 15 años, siendo la ataxia de la marcha la manifestación más temprana (Bidichandani y Delatycki, 1998).

La debilidad muscular es también un síntoma frecuente, siendo ésta notable en los extensores y abductores de la cadera y, conforme avanza la enfermedad, se hace más evidente en las extremidades distales (Bidichandani y Delatycki, 1998). La disfagia es otro síntoma común en la FRDA, afectando a la calidad de vida de un elevado porcentaje de pacientes (Keage, Delatycki, Gupta, Corben y Vogel, 2017). Además, encontramos anomalías esqueléticas como la escoliosis, la cual está presente en aproximadamente dos tercios de las personas con FRDA (Bidichandani y Delatycki, 1998).

La cardiomiopatía hipertrófica, definida como el aumento del grosor del tabique interventricular, está presente en dos tercios de los pacientes con FRDA. Los síntomas relacionados con la cardiomiopatía suelen aparecer en las etapas tardías de la enfermedad, salvo en casos raros que pueden preceder a la ataxia (Bidichandani y Delatycki, 1998). Las arritmias, especialmente la fibrilación auricular, y la insuficiencia cardíaca congestiva, suelen producirse con frecuencia en las etapas tardías de la enfermedad y constituyen la causa más común de mortalidad de los pacientes (Tsou *et al.*, 2011).

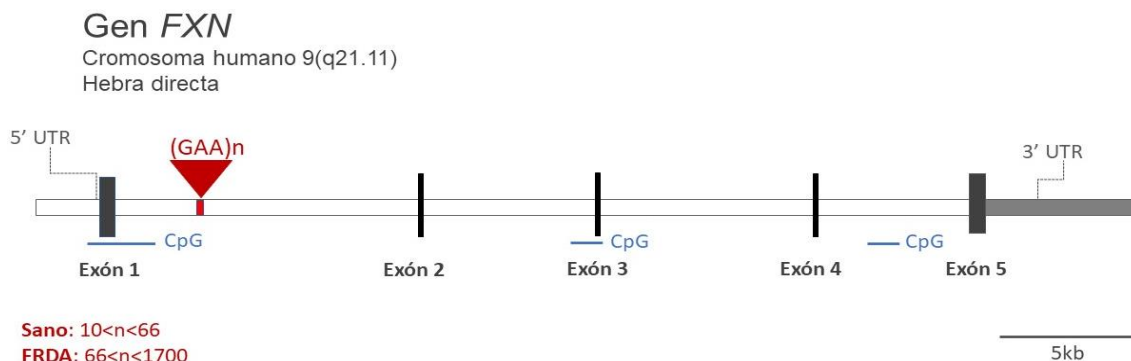
Se ha observado la aparición de diabetes mellitus en un 30% de los pacientes con FRDA y un 49% adicionales de pacientes manifiesta intolerancia a la glucosa (Cnop, Mulder y Igoillo-Esteve, 2013).

La velocidad de progresión de la FRDA es variable. El tiempo medio desde el inicio de los primeros síntomas hasta la dependencia completa de una silla de ruedas es de unos 10 años (Dürr *et al.*, 1996). Se ha determinado en estudios recientes que la edad media de fallecimiento de los pacientes con FRDA es de 36.5 años (Tsou *et al.*, 2011).

### **1.2.2 Estructura y regulación del gen *FXN***

El gen *FXN*, codificante de la frataxina, se localiza en la región 9q21.11 (OMIM; NCBI, *Centro Nacional para la Información Biotecnológica*), este contiene 5 exones y se extiende alrededor de 80kb de ADN (**Figura 1**).

Respecto a los elementos reguladores del gen *FXN* (**Figura 1**), se han localizado tres islas citosina-fosfoguanina (CpG), la primera de ellas en el exón 1 y se extiende hasta el intrón 1 (Yandim, Natisvili y Festenstein, 2013). Es importante destacar que dentro del exón 1 se encuentra un microsatélite formado por repeticiones del triplete GAA en el centro de un elemento Alu, donde se cree que se originaron dichas repeticiones (Clark *et al.*, 2004).



**Figura 1. Estructura y elementos reguladores del gen FXN.** El gen FXN, consta de cinco exones y cuatro intrones. Se han identificado tres islas citosina-fosfoguanina (CpG) en FXN. Es importante destacar que el primer intrón de FXN contiene varias repeticiones triples (GAA) *n*. Hay aproximadamente 10–66 repeticiones en individuos sanos, pero números más altos (aproximadamente 66–1700) están asociados con la ataxia de Friedreich, donde el gen FXN está patológicamente silenciado. Adaptada de Clark *et al.*, 2004.

La mayoría de los pacientes con ataxia de Friedreich presentan una expansión de las repeticiones GAA, debido a mutaciones facilitadas por mecanismos relacionados con la transcripción, replicación y reparación del ADN. Como resultado de dicha expansión, se ha observado una reducción de los niveles de ARNm (*ARN mensajero*) del gen FXN en pacientes de FRDA alrededor del 4-30%, respecto a valores observados en individuos no afectados (Campuzano *et al.*, 1997). Estos resultados permiten establecer una clara correlación con la reducción de los niveles de la proteína frataxina (Saccà *et al.*, 2011). Respecto a la vida media del ARNm de FXN no se ha observado que haya ninguna diferencia entre los pacientes de FRDA y los controles, y no hay evidencias de que la expansión del triplete GAA afecte al procesado del ARN del gen FXN (Punga y Bühler, 2010).

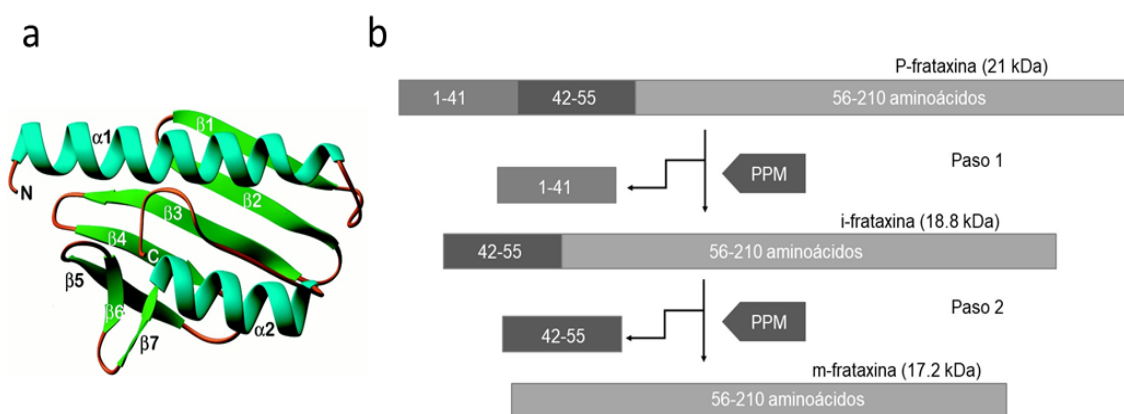
La regulación negativa de la expresión del gen FXN se debe a diversos mecanismos de inhibición, como la formación de estructuras de ADN no-B a partir de la expansión de repeticiones GAA, lo que conduce a un bloqueo físico de la maquinaria transcripcional de la ARNPII (*ARN polimerasa II*) al dificultar el desenrollamiento del ADN molde y el avance del complejo de elongación de la ARNPII (Sandi *et al.*, 2014); el silenciamiento epigenético (Sandi *et al.*, 2014); la metilación e hidroximetilación en sitios CpG en regiones aguas arriba de las repeticiones GAA del locus FXN (Greene *et al.*, 2007); las modificaciones postraduccionales de histonas (Sandi, Al-Mahdawi y Pook, 2013); y la transcripción antisentido de ARN y la unión de CTCF (De Biase, Chutake, Rindler y Bidichandani, 2009).

### 1.2.3 La proteína frataxina

#### 1.2.3.1 Estructura y procesamiento de frataxina

Frataxina es una proteína muy conservada que puede encontrarse desde bacterias gran negativas hasta eucariotas superiores. Es una pequeña proteína mitocondrial implicada en la biogénesis de centros Fe-S (o ISC, *centros ferrosulfurados*), entre otras posibles funciones. La frataxina presenta un plegamiento único, el cual combina dos  $\alpha$ -hélices que conforman un plano, cinco láminas  $\beta$  antiparalelas que conforman el segundo plano de la proteína. También podemos encontrar una sexta lámina  $\beta$ , y en el caso de la frataxina humana, una séptima (Bencze *et al.*, 2006) (**Figura 2a**). La región principal implicada en la unión a los átomos de hierro es la denominada región ácida, compuesta por una serie de residuos ubicados en la primera  $\alpha$ -hélice y en el borde de la primera lámina  $\beta$  (Foury, Pastore y Trincal, 2006).

La proteína es procesada por una peptidasa de procesamiento mitocondrial (PPM, *peptidasa de procesamiento mitocondrial*) en dos pasos para generar una forma madura de la proteína, que se dirige a las mitocondrias. La proteína nativa con un peso molecular de aproximadamente 21kDa se convierte inicialmente en una forma intermedia de frataxina (*i-fxn*) de aproximadamente 18.8kDa, que posteriormente se procesa a la forma madura de frataxina (*m-fxn*) de aproximadamente 17.2kDa (**Figura 2b**) (Muthuswamy y Agarwal, 2015).



**Figura 2. Estructura 3D y procesamiento de la frataxina.** a) El plegamiento de la frataxina está compuesto por un sándwich compacto  $\alpha\beta$ , con  $\alpha$ -hélices de color turquesa y láminas  $\beta$  verdes. Las láminas  $\beta 1$ -  $\beta 5$  son antiparalelas e interactúan con las dos  $\alpha$ -hélices,  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . Una segunda lámina  $\beta$  de menor tamaño está formada por el extremo C-terminal y las láminas  $\beta 6$  y  $\beta 7$ ; (extraída de Dhe-Paganon, Shigeta, Chi, Ristow y Shoelson, 2000). b) Procesamiento de la frataxina en dos pasos por la peptidasa de procesamiento mitocondrial (PPM). En el paso uno, la frataxina de 210 aminoácidos se escindió inicialmente

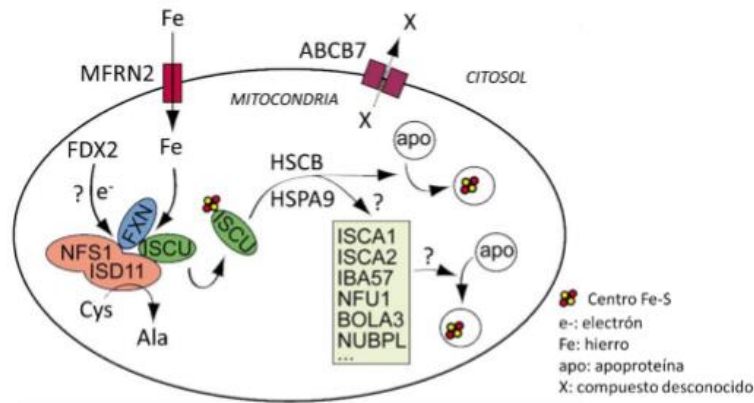
en la posición 41-42 para producir la frataxina intermedia (*i-fxn*) de 18.8kDa. En el paso dos, se hidrolizó adicionalmente para producir la forma madura de frataxina (*m-fxn*) de 17.2kDa. Adaptada de Muthuswamy y Agarwal, 2015.

### **1.2.3.2 Función de la proteína frataxina**

Originalmente, debido a la capacidad de formar estructuras oligoméricas capaces de capturar átomos de hierro, se propuso que la frataxina pudiera tener una función similar a la ferritina, aportando a la mitocondria el hierro biodisponible (Adamec *et al.*, 2000). Sin embargo, posteriores estudios realizados en levaduras expresando ferritina mitocondrial humana mostraron que la función de ambas proteínas era diferente (Sutak *et al.*, 2012).

Su función exacta sigue siendo hoy en día materia de controversia, pero la hipótesis más aceptada la relaciona con la maquinaria de biosíntesis de centros Fe-S apoyando el papel de la proteína en el metabolismo del hierro mitocondrial (Martelli y Puccio, 2014) (**Figura 3**). Los centros Fe-S son un tipo de cofactores de proteínas presentes en casi todos los organismos vivos. Estos presentan un papel crítico en diversas funciones celulares, desde el transporte electrónico en los complejos respiratorios mitocondriales hasta la reparación del ADN o el metabolismo.

Estudios recientes sugieren que la frataxina podría actuar como regulador de la síntesis de tales centros, mediante la unión de esta al complejo ISCU (*enzima de ensamblaje de centros Fe-S*)/ NFS1 (*cisteína desulfurasa*)/ ISD11 es capaz de estabilizar el mismo y de activar la actividad cisteína desulfurasa y regular así la entrada de hierro al complejo (Colin *et al.*, 2013). Aunque se desconoce el mecanismo por el que la frataxina es capaz de controlar la entrada de hierro.



**Figura 3. Esquema de la maquinaria de biosíntesis de centros Fe-S mitocondrial.** El hierro se introduce en la mitocondria mediante los transportadores MFRN. Los centros Fe-S se ensamblan en un complejo formado por NFS1-ISD11, ISCU y frataxina, la cual regula la actividad de NFS1 y la entrada de hierro. Una vez ensamblado, el centro Fe-S se transfiere a unas proteínas aceptoras mediante diferentes chaperonas (HSCB/HSPA9). Un intermediario desconocido (X), se exportaría al citosol por medio de transportadores ABCB7 para el ensamblaje de centros Fe-S de proteínas citosólicas y nucleares. MFRN2: *Mitoferrina 2*, NFS1: *cisteína desulfurasa mitocondrial*, ISD11: LYRM4 (*proteína 4 que contiene motivos LYS*), ISCU: *enzima de ensamblaje de centros Fe-S*, HSCB: *chaperona mitocondrial HscB de los centros Fe-S*, HSPA9: *proteínas de choque térmico familia A (Hsp70) miembro 9*. Adaptada de Martelli y Puccio, 2014.

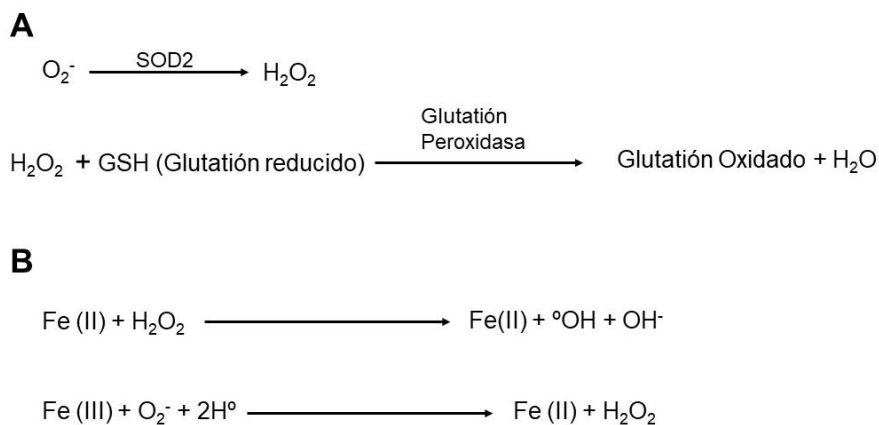
### 1.2.4 Patología molecular

Entre las consecuencias fisiológicas del déficit de frataxina destacan la interrupción severa de las enzimas con centros ferrosulfurados (ISC) (Martelli *et al.*, 2007), la acumulación mitocondrial de hierro, unido a una desregulación celular de este, (Babcock *et al.*, 1997; Foury y Cazzalini, 1997) y una mayor sensibilidad al estrés oxidativo (Wong *et al.*, 1999). Debido al estrecho vínculo entre las tres vías es complicado determinar la causa principal de la enfermedad.

La primera evidencia que relaciona a la frataxina con el metabolismo del hierro surge con la identificación del aumento del contenido de hierro en corazones de pacientes con FRDA (Lamarche, Côté y Lemieux, 1980), y en las mitocondrias de cepas de levaduras modificadas con una deleción del homólogo de la frataxina en levaduras (Yfh1) (Babcock *et al.*, 1997; Foury y Cazzalini, 1997). Así como, se ha descrito una alteración de la actividad o expresión de diversas proteínas implicadas en el metabolismo del hierro como IRP1 y 2 (*proteínas reguladoras de hierro 1 y 2*), TFR1 (*receptor de transferrina 1*), FRTL (*cadena ligera de ferritina*), FRTH (*cadena pesada de ferritina*), FPN (*ferroportina*) y MFRN2 (*mitoferrina-2*) provocando un aumento de la importación del hierro al interior mitocondrial. Estas alteraciones en el metabolismo del hierro, junto con

la inhibición de procesos en los que este se encuentra implicado, terminan en su acumulación al no poder ser exportado de la mitocondria en forma de otros metabolitos, como los centros Fe-S o grupos hemo (Martelli y Puccio, 2014; Chiang *et al.*, 2016). Estos estudios sugieren, por lo tanto, que la frataxina juega un papel fundamental en la regulación del transporte mitocondrial del hierro. Además, se ha observado una reducción en la función de las proteínas que requieren centros Fe-S, como los complejos respiratorios I, II y III de la mitocondria y las aconitasas citosólicas y mitocondriales (Rötig *et al.*, 1997; Condò *et al.*, 2010).

Respecto a la sensibilidad al estrés oxidativo, están implicadas diferentes sistemas antioxidantes, como las superóxido dismutasas (SODs), las glutatión peroxidasas (GPXs), la *nicotinamida adenina dinucleótido fosfato* (NADPH) y el tripéptido glutatión (GSH) considerado en eucariotas como el antioxidante no enzimático más importante (Calabrese *et al.*, 2005). A nivel mitocondrial, se observa que la enzima SOD2 (*superóxido dismutasa [Mn], mitocondrial*) actúa sobre el  $O_2^-$  para catalizar la formación de  $H_2O_2$ . A continuación, el GSH reacciona con el  $H_2O_2$  en presencia de la enzima GPX, para producir glutatión oxidado (GSSG) y  $H_2O$  (**Figura 4A**). Debido a la presencia de un exceso de los niveles de hierro se produce una interferencia en las etapas anteriores formando  $H_2O_2$  y OH mediante la denominada reacción de Fenton en la que participa el hierro (**Figura 4B**), lo que supondría un mecanismo alternativo por el que se generan radicales libres en la FRDA. Siendo estos capaces de causar la peroxidación de lípidos, dañar las proteínas y los ácidos nucleicos (Linseman, Larson, Braughler y McCall, 1993).

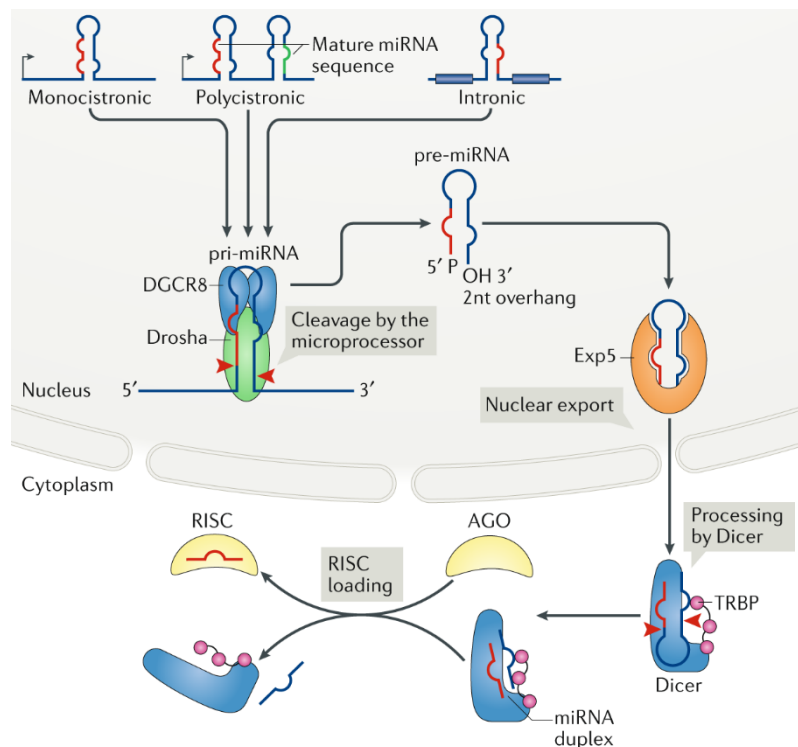


**Figura 4. Ecuación de neutralización del oxígeno reactivo por enzimas antioxidantes (A) y la reacción de Fenton (B).** Adaptada de Muthuswamy y Agarwal, 2015.

Se ha observado en diversos estudios realizados con fibroblastos de pacientes con FRDA, que estos, a diferencia de los controles sanos, son sensibles a bajas dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, oligomicina o hierro, siendo incapaces de regular un aumento en la expresión de las SOD en respuesta a inductores del estrés oxidativo (Paupe *et al.*, 2009; Jiralerspong, Ge, Hudson y Pandolfo, 2001; Chantrel-Groussard *et al.*, 2001). Varios estudios sugieren que la deficiencia de frataxina conduce a un deterioro en la homeostasis del glutatión. (Shan *et al.*, 2013; Napoli, Taroni y Cortopassi, 2006; Auchere, Santos, Planamente, Lesuisse y Camadro, 2008). Estos estudios apoyan la hipótesis de que la deficiencia de frataxina provoca una desregulación de las defensas antioxidantes, lo que genera estrés oxidativo y la patología resultante (Santos *et al.*, 2010; Armstrong, Khmour y Hecht, 2010; Shan *et al.*, 2013).

### 1.3 Los microARN y la FRDA

Los microARN (miARN) son una clase de pequeñas moléculas de ARN no codificantes (~18 nucleótidos de longitud) involucrados en la regulación de la expresión génica. Estos se transcriben en el núcleo y necesitan de un proceso de maduración para poder ejercer su función regulatoria (**Figura 5**).



**Figura 5. Biosíntesis de los miARN.** Los miARN se transcriben en el núcleo a partir del genoma por las ARN polimerasas II o III para formar el miARN primario (Pri-miARN). Este es modificado mediante la adición

de una caperuza y poliadenilación. Después es procesado en el núcleo por el complejo Drosha/DGCR8, el cual genera un precursor de miARN con forma de horquilla (Pre-miARN). El Pre-miARN es exportado al citoplasma gracias al transportador Exportin-5, y es sucesivamente procesado por Dicer y las proteínas de unión al ARN respuesta trans-activación (TRBP) que eliminan la horquilla. Finalmente, una de las dos hebras del dúplex de miARN se incorpora a la proteína Argonaute (AGO) para formar el complejo de silenciamiento inducido por ARN (miRISC), el cual finalmente silencia el ARNm diana mediante su represión traduccional o su degradación. Adaptada de Treiber, Treiber y Meister, 2018.

Se han identificado varios miARN implicados en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer (Cogswell *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2008; Sonntag, 2010), lo que sugiere que, en otras enfermedades neurodegenerativas, como la FRDA podrían jugar un papel relevante.

Un estudio reciente sobre el papel de los miARN en la FRDA analizó los niveles de miARN circulantes en plasma de pacientes con FRDA mediante la secuenciación de ARN pequeños y determinó que “miR-323-3p” es un potencial biomarcador para monitorizar la progresión de la cardiomiopatía (Seco-Cervera *et al.*, 2017). Otro estudio realizado en plasma de pacientes con FRDA, identificó unos 20 miARN desregulados respecto al grupo control, 17 de ellos estaban regulados al alza y 3 de ellos a la baja, lo que demostró que podrían estar asociados con la neurodegeneración y otras características clínicas de la enfermedad (Dantham, Srivastava, Gulati y Rajeswari, 2017).

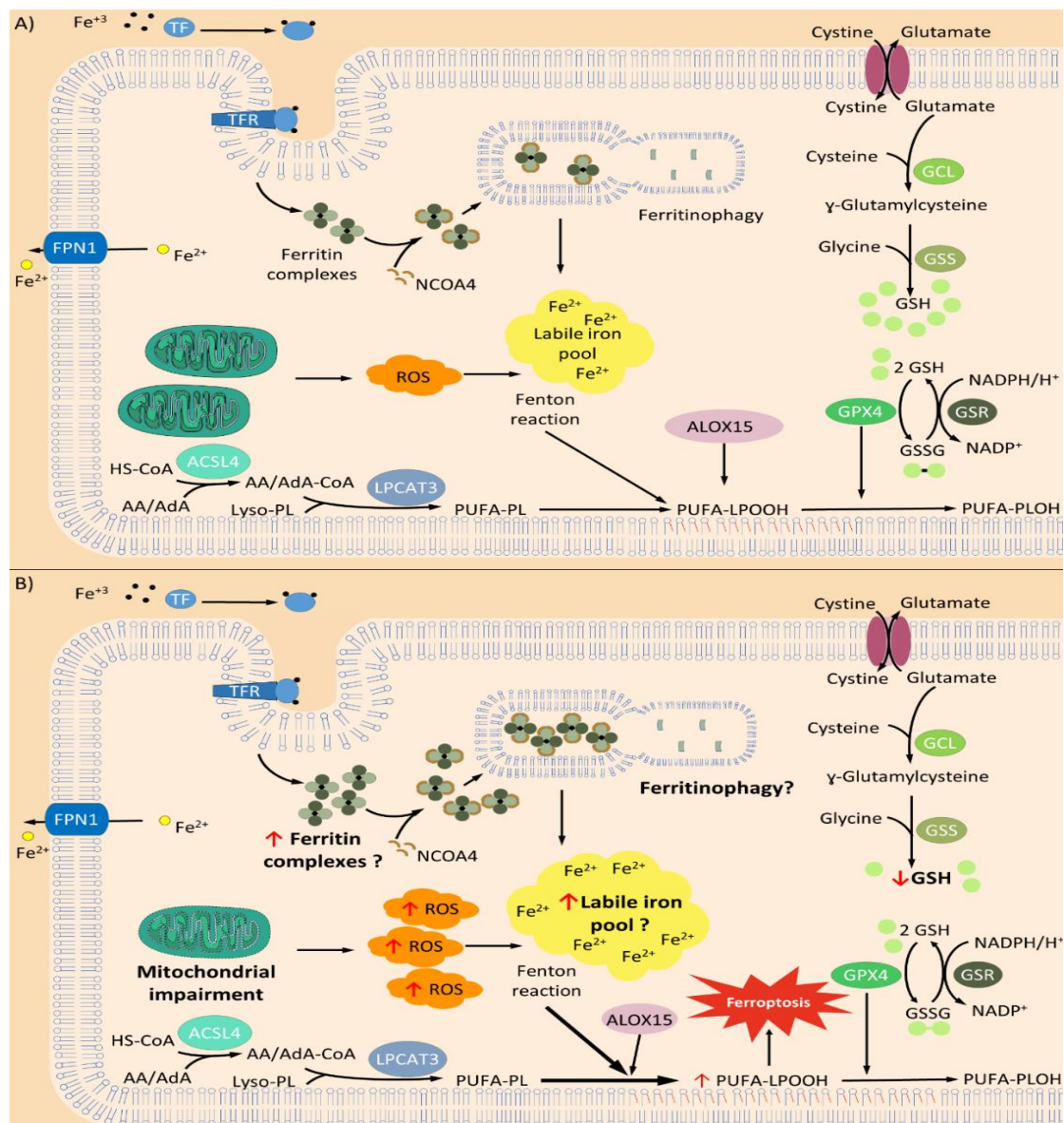
Hasta ahora se ha tratado de comprender la variabilidad fenotípica de los pacientes para diseñar la terapia más adecuada para cada uno de ellos, basándose en una única vía metabólica implicada en la FRDA, sin considerar otros mecanismos moleculares implicados. Por lo tanto, el estudio de los patrones de miARN en la FRDA podría aportar un nuevo panorama de mecanismos patológicos que ocurren durante la historia natural de la enfermedad, ya que los niveles de miARN pueden cambiar con la progresión de la enfermedad. Esto supone una nueva visión de la enfermedad y del importante papel de los miARN en la patogénesis de la FRDA.

## **1.4 Ferroptosis en la ataxia de Friedreich**

La ferroptosis es un nuevo tipo de muerte celular recientemente identificada por Dixon *et al.* en 2012, la cual es dependiente del hierro. La muerte por ferroptosis se ha relacionado con la acumulación de hierro y peroxidación de lípidos, lo que hace que este

proceso de muerte celular sea genética y bioquímicamente distinto al de la apoptosis o las vías necróticas (Li *et al.*, 2020). No presenta las características de la necrosis típica, como la inflamación del citoplasma y los orgánulos o la ruptura de la membrana celular, ni presenta las características de la apoptosis celular tradicional, como la contracción celular, la condensación de la cromatina, la formación de cuerpos apoptóticos o la desintegración del citoesqueleto. Morfológicamente, la ferroptosis se caracteriza por una contracción de las mitocondrias junto a un aumento de la densidad de la membrana y una reducción o desaparición de las crestas mitocondriales, lo que la diferencia de cualquier otro modo de muerte celular (Li *et al.*, 2020).

Los detalles del proceso ferroptótico siguen bajo investigación, se han identificado diversos componentes de la vía de la ferroptosis en la literatura como efectos aislados, pero todavía se desconocen sus conexiones. Algunos de estos componentes implicados en la ferroptosis están implicados en el metabolismo y transporte del hierro, la biosíntesis de ácidos grasos y la respuesta antioxidante frente al acumulo de lípidos de membrana oxidados (**Figura 6a**).



**Figura 6. Principales mecanismos de la ferroptosis.** A) Proceso general de la ferroptosis. Los niveles equilibrados de ERO y la actividad antioxidante mantienen la vía de muerte celular por ferroptosis inactiva. Cambios en la absorción o la exportación de hierro producen una activación de la ferroptosis. La ferritinofagia mediante la ferritina, que capta el hierro y es dirigida por el receptor nuclear coactivador 4 (NCOA4) al lisosoma para su degradación, podría mejorar la ferroptosis. El aumento de los niveles intracelulares de hierro libre induce la reacción de Fenton, la cual aumenta la producción de ERO. Además, la acción de oxidasas dependientes de hierro (ALOX15), oxida los fosfolípidos de los ácidos grasos araquidonato o adrenato, desencadena la ferroptosis. El aumento de la actividad del miembro 4 de la familia de cadena larga de acil-CoA sintetasa (ACSL4) aumenta la ferroptosis. La inhibición de la enzima GPX4 o la ausencia de GSH provoca la acumulación de lípidos hidroxilados que desencadenan el proceso de ferroptosis. B) Mecanismos sugeridos de la ferroptosis en la FRDA. Se ha observado un aumento de los niveles de lipoperóxidos y ERO en las neuronas de pacientes con FRDA. Además, se ha observado una desregulación del GSH. Estas características de la FRDA indican que la ferroptosis puede tener un papel en la fisiopatología de la enfermedad. *Receptor de transferrina (TFR)* *Lisofosfatidilcolina Aciltransferasa 3 (LPCAT3)*; *Glutamato Cisteína Ligasa (GCL)*; *Glutatión sintetasa (GSS)*; *Glutatión reductasa (GR)*. ↑ indica niveles aumentados y ↓ indica niveles reducidos. Extraída de Espinós et al., 2020.

Es de especial importancia el sistema antioxidante Xc<sup>-</sup>/GSH/GPX4, puesto que la inhibición de la enzima glutatión peroxidasa 4 (GPX4) (Gaschler y Stockwell, 2017; Yang *et al.*, 2016) o la falta de GSH disponible (Cao *et al.*, 2019; Dixon *et al.*, 2012), provocan la acumulación de lípidos hidropoxidados en presencia de hierro catalíticamente activo. Por lo que, alteraciones en cualquiera de estos componentes pueden desencadenar los mecanismos de la ferroptosis. El primer componente de este eje es el sistema Xc<sup>-</sup>, el cual se trata de un antiportador de glutamato/cistina. Una vez es importada, esta es reducida a cisteína y utilizada por las enzimas Cisteína-glutamato Ligasa (GCL) y Glutathion sintetasa (GSS) para la síntesis de GSH. Todas aquellas condiciones que afecten a biosíntesis de GSH, afectarán de forma directa sobre la actividad de la enzima GPX4, y por tanto a una predisposición a la ferroptosis. El papel de la enzima GPX4 como principal regulador en el proceso de ferroptosis, se basa en su función única de reducir los hidroperóxidos complejos, incluidos los hidroperóxidos fosfolipídicos y los hidroperóxidos de colesterol a sus formas correspondientes, interrumpiendo así la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. De hecho, diversos estudios evidenciaron que la delección de *Gpx4* en ratones provocó la neurodegeneración y muerte celular de las neuronas de forma no apoptótica sino mediante la acumulación masiva de lípidos peroxidados (Friedmann Angeli *et al.*, 2014; Seiler *et al.*, 2008).

Aunque los mecanismos de ferroptosis como la biodisponibilidad de cisteína, de GSH o el correcto funcionamiento de GPX4 se han descrito correctamente, se conoce bastante menos acerca de los mecanismos implicados en la acumulación de lipoperóxidos y la posterior señalización de muerte celular. Estudios genéticos identificaron al miembro 4 de la familia de cadena larga de la acil-CoA sintetasa (ACSL4) como un factor adicional y esencial en el proceso de ferroptosis (Dixon *et al.*, 2015; Doll *et al.*, 2017). ACSL4 es una de las enzimas activadoras de ácidos grasos, que funcionan esterificando la Coenzima A (CoA) para liberar ácidos grasos de forma dependiente de ATP. A diferencia de otras enzimas de la familia, ACSL4 muestra una mayor afinidad por los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPIs) como el ácido araquidónico (AA) o el ácido adrenico (AdA), lo que se ha visto que contribuye a la ferroptosis (Kagan *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2016). Los lípidos peroxidados se forman típicamente a partir de las cadenas AGPI de lípidos de membrana y restos de araquidonato o adrenato. Estos son susceptibles a la oxidación enzimática, catalizada por lipoxigenasa (ALOX15), y no enzimática, catalizada por ERO, lo que conduce a la formación de hidroperóxidos lipídicos (Cheng y Li, 2007). En presencia de hierro, los hidroperóxidos lipídicos pueden formar radicales lipídicos tóxicos que se propagan, generando la fragmentación de AGPI

en una variedad de productos (Cheng y Li, 2007). Los eventos moleculares que ocurren aguas abajo de la fragmentación oxidativa de AGPI para causar la muerte celular irreversible no están claros.

La amplificación del triplete GAA en la FRDA se ha relacionado estrechamente con la acumulación de hierro en las mitocondrias y un aumento de los niveles de lípidos oxidados, lo que sugiere que la FRDA puede estar muy relacionada con la ferroptosis (Figura 10b) (Codazzi *et al.*, 2016). Un estudio realizado con fibroblastos humanos, con un silenciamiento del gen *FXN*, en el cual emplearon inhibidores de ferroptosis como el SRS11-92, demostró que se produjo una disminución de la muerte celular (Grazia Cotticelli *et al.*, 2019).

El descubrimiento de la vía de ferroptosis como una posible forma de muerte celular en la FRDA es un hallazgo importante ya que aporta significado a muchas de las características celulares, metabólicas y fisiopatológicas ya conocidas de la degeneración neuronal en la FRDA, como el estrés oxidativo, los cambios en los niveles de calcio intracelular, la degeneración neuronal y el daño mitocondrial. Toda esta información tomada junto a los estudios realizados con miARN (Seco-Cervera *et al.*, 2017), los cuales sugieren que los niveles de miARNs implicados en la regulación de proteínas implicadas en el metabolismo de los ácidos grasos y la  $\beta$ -oxidación podrían afectar a la regulación de la ferroptosis, indican que la ferroptosis podría ser una vía importante vinculada a la fisiopatología de la FRDA, y por ello, un objetivo terapéutico principal.

## **1.5 Hipótesis planteada**

Dada la heterogeneidad fenotípica observada en los pacientes de ataxia de Friedreich y la ausencia de marcadores de pronóstico y seguimiento de ensayos clínicos fiables, es más que patente la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores. Estudios recientes, han observado el papel de los miARN en la ataxia de Friedreich, como biomarcadores de cardiomiopatía y neurodegeneración. Además, parece que los miARN podrían estar implicados en la regulación de proteínas del metabolismo de los ácidos grasos y la  $\beta$ -oxidación, que podrían afectar a la regulación de la ferroptosis.

Por ello, nuestra hipótesis plantea que el estudio de expresión diferencial de miARN puede dilucidar diferencias en el perfil de expresión en un modelo celular neuronal de la ataxia de Friedreich y ayudar a la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de esta enfermedad, así como proporcionar nuevas dianas moleculares y biomarcadores para esta neuropatía.



## **2. Objetivos**

---

Como **objetivo principal** para llevar a cabo la hipótesis de trabajo, se estableció el estudio de expresión de miARN en un modelo celular neuronal de la ataxia de Friedreich y su implicación en la regulación de las rutas implicadas en la fisiopatología de esta enfermedad, a partir de datos previos de secuenciación de ARN pequeño llevado a cabo en el laboratorio.

Para ello se realizarán los siguientes **objetivos específicos**:

1. Validación de los miARN con expresión diferencial obtenidos previamente en el grupo en un estudio de secuenciación de ARN pequeños.
2. Análisis bioinformático de las rutas y genes regulados por estos miARN.
3. Validación de las dianas de estos miARN en las rutas más relevantes por RT-qPCR y Western-blot.
4. Análisis de los niveles de GSH, su estado redox y enzimas de síntesis.



### 3. Materiales y Métodos

---

#### 3.1 Cultivos celulares

El cultivo celular es un método mediante el cual podemos mantener en condiciones controladas un tipo celular de interés. En nuestro caso utilizamos un modelo deficiente en la proteína frataxina en la línea celular SH-SY5Y.

La línea celular SH-SY5Y se subclonó a partir de la línea celular conocida como SK-N-SH, descrita por primera vez por Biedler, Roffler-Tarlov, Schachner y Freedman en 1978. Las células SK-N-SH originales se obtuvieron de una biopsia de médula ósea de una mujer de cuatro años según el método descrito por Biedler, Helson y Spengler en 1973. Las células SH-SY5Y se transfectaron con el vector pLKO.1 para obtener los modelos de silenciamiento de la frataxina. La línea celular pLKO.1-NT se trata de una línea celular control con una secuencia de ARN de interferencia no dirigido. FXN-138.1 y FXN-138.2 fueron las líneas celulares con un silenciamiento de la frataxina con una reducción del 82% y 68% de los niveles de proteína, respectivamente. Todas las líneas celulares se obtuvieron con la amabilidad del laboratorio del Dr. Francesc Palau.

Se dejó descongelar los viales necesarios, que estaban en nitrógeno líquido en el termostato a 37°C. Una vez estuvieron listas y trabajando en condiciones de máxima esterilidad (campanas de flujo laminar tipo 2A), se resuspendieron en 2mL de medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium-Ham's F12 Nutrient Mixture* (DMEM/F-12; 11320033, Gibco, Walham, MA, EE.UU.) suplementados con 10% suero bobino fetal inactivado (SBF; 26140, Gibco, Walham, MA, EE. UU.), 2mM de L-glutamina (25030081, Gibco, Walham, MA, EE.UU.) y 1% de antibióticos penicilina/estreptomicina (15140122, Gibco, Walham, MA, EE. UU.), y se homogeneizaron. Se centrifugaron durante 5 minutos a 25°C y una velocidad de 1.500 *rpm*, se retiró el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 10mL de medio DMEM/F-12 suplementado. Se cultivaron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> a 37°C, en una atmósfera de humedad saturada que contenía el 20% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> en el incubador (ThermoFisher Scientific, Heracell 150i CO2 incubator, Walham, MA, EE. UU.).

Las células SH-SY5Y se cultivaron a lo largo de todo el trabajo, para los pases celulares se utilizaron 1·10<sup>6</sup> células junto con 15mL de medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con 10% de SBF inactivado, 2mM de L-glutamina y 1% de antibióticos

penicilina/estreptomicina. Además, a las líneas celulares transfectadas se les añadió 2µg/µL de puromicina como marcador selectivo. Las células se mantuvieron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> a 37°C, en una atmósfera de humedad saturada que contenía el 20% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> en el incubador (ThermoFisher Scientific, Heracell 150i CO<sub>2</sub> incubator, Walham, MA, EE. UU.).

### **3.2 Extracción de los miARN y del ARNm**

La extracción de los miARN y del ARNm se realizó en conjunto y sirvió para analizar los niveles de expresión génica de los miARN y genes de interés. Para la extracción se utilizó el kit *mirVana™ miRNA Isolation Kit* (AM1560, ThermoFisher Scientific, MA, EE. UU.).

Para la extracción se lisaron aproximadamente 1·10<sup>6</sup> células. Para ello, se eliminó el medio que contenían los frascos con las células, se realizaron dos lavados con 5mL de PBS y se añadieron 3mL de tripsina a cada frasco. Se dejaron incubar durante 5 minutos a 37°C, pasado este tiempo se añadió 5mL de DMEM/F-12 suplementado, para inhibir la acción de la tripsina. Se recogió el contenido de cada frasco en tubos y se centrifugó durante 5 minutos a 1.500rpm y 25°C. Después, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 5mL de PBS, y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones descritas anteriormente.

En segundo lugar, se realizó la ruptura de las células. Para ello, se retiró el PBS tras la centrifugación y se añadieron 600µL de la solución de lisis/unión, proporcionada por el kit. Después, se realizó la extracción orgánica del ARN total y de los miARN, se añadieron 60µL de la solución *miRNA Homogenate Additive* proporcionada por el kit a cada una de las muestras. Tras esto, se agitaron y se dejaron en hielo durante 10 minutos. Luego, se añadieron 600 µL de ácido-fenol:cloroformo (igual al volumen del lisado antes de agregar la solución *miRNA Homogenate Additive*), y se agitaron durante 60 segundos. Seguidamente, se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000g y 4°C, para separar la fase acuosa de la fase orgánica. Una vez separadas, se retiró la fase acuosa con cuidado de no tocar la fase inferior, se transfirió a un tubo nuevo y se anotó el volumen extraído, obteniendo un extracto de ARN semi-puro.

En último lugar, se realizó la purificación del ARN total, que incluye el ARNm y los miARN. Para la purificación del ARN total, se añadieron 750µL de etanol 100% a cada una de las muestras y se homogenizaron. Tras esto, se añadieron 700µL de la muestra

homogenizada a la columna con un filtro de fibras de vidrio que retienen los ARN, colocadas sobre un tubo colector, y se centrifugaron durante 15 segundos a 10.000g y 25°C para realizar el filtrado. Este procedimiento se repitió añadiendo los aproximadamente 700 µL restantes. Una vez retenidos los ARN totales en las fibras de la columna, se realizaron los pasos de lavado. Para el primer lavado, se añadieron 750µL *Wash Solution 1* a cada columna y se centrifugaron durante 5 segundos a 10.000g y 25°C, luego se eliminó el filtrado de cada una de las muestras. Para el segundo y tercer lavado, se añadieron 500µL *Wash Solution 2/3* y se centrifugaron durante 5 segundos a 10.000g y 25°C para el segundo lavado y durante 1 minuto a 10.000g y 25°C para el tercero de ellos, eliminando el fluido filtrado. Finalmente, se procedió a eluir los ARN con una solución de baja fuerza iónica (agua libre de nucleasas). Para ello, las columnas se colocaron sobre un nuevo tubo colector, se añadieron 100µL de esta agua en el centro del filtro de la columna y se centrifugaron durante 30 segundos a 10.000g y 25°C. Los filtrados obtenidos, que contienen los ARN totales, se almacenaron a -80°C.

Previo a su almacenaje y para evitar ciclos innecesarios de congelación/descongelación, se determinó la concentración de ARN total de las muestras mediante los valores de absorbancia a 260nm (A260) en el espectrofotómetro *NanoDrop™ One/OneC* (ThermoFisher Scientific, Walham, MA, EE. UU.). Otro valor que se tuvo en cuenta fue la relación de A260 a A280, que indica la relación de la pureza del ARN respecto al ADN.

### **3.3 Análisis por RT-qPCR de los miARN**

Para la cuantificación de la expresión génica se empleó una variante de la PCR que permite cuantificar la cantidad de miARN a la vez que se amplifica la secuencia específica del gen que se desea cuantificar: RT-qPCR. Para ello, primero se retrotranscribe la hebra de ARN a ADN complementario (ADNc) mediante el empleo de la enzima transcriptasa reversa (RT). Y después, este ADNc se amplifica mediante una PCR en tiempo real (RT-qPCR).

En primer lugar, se realizó la retrotranscripción (RT-PCR) de los miARN, que se preparó en una placa de 96 pocillos. La RT-PCR puede ser específica para cada uno de los miARN de interés o se puede realizar un multiplexado mediante el uso en conjunto de diversos cebadores específicos para cada uno de los miARN a analizar. En nuestro caso, se realizó el multiplexado de los diferentes miARN de interés (hsa-miR-10b-5p

(002218), hsa-mir-106b-3p (002380), hsa-mir-106b-5p (000442), hsa-mir-15a-3p (002419), hsa-mir-409-3p (002332), RNU48 (001006); ThermoFisher Scientific, Walham, MA, EE.UU.). En cada pocillo se añadieron 5.35µL de la muestra correspondiente de miARN (100ng de muestra, complementando hasta los 5.35µL con agua libre de ARNasas) y 14.65µL de *TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit* (10x *RT Buffer* (2µL), 25x *dNTP Mix* 100mM (0.4µL), 5x *Pool RT Primers* (8µL), *Multiscribe Reverse Transcriptase* 50U/µL (4µL) e inhibidor de ARNasa 20U/µL (0.25µL); 4366597, ThermoFisher Scientific, Walham, MA, EE. UU.). La RT-PCR se realizó en el termociclador 2720 Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific, Walham, MA, EE. UU.), con las siguientes condiciones: un primer periodo de incubación a 16°C durante 30 minutos, que permite la unión de los cebadores específicos, seguido de un periodo de 30 minutos a 42°C que permite la síntesis del ADNc y un último periodo de inactivación de 5 minutos a 85°C.

Una vez obtenido el ADNc se realizó la amplificación mediante RT-qPCR. En nuestros experimentos se emplearon los ensayos prediseñados de *Taqman MicroRNA Assay*. Estas sondas fluorescentes poseen en uno de sus extremos un fluoróforo y en el otro extremo un *quencher* o desactivador, que impide la emisión de fluorescencia por parte del fluoróforo del otro extremo. Sin embargo, una vez unidas las sondas al ADNc, la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa libera el extremo del fluoróforo, alejándolo del *quencher* y permitiendo, por tanto, la emisión de fluorescencia. La fluorescencia es detectada mediante la excitación con el láser correspondiente.

La cuantificación de la señal de fluorescencia se puede realizar de manera absoluta, obteniendo la cantidad exacta de moléculas de ADN mediante una curva estándar, o de manera relativa empleando genes de referencia con expresión constitutiva para determinar las diferencias de expresión que existen entre ellos. En nuestro caso, se utilizó el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen, 2001) para la obtención de estos datos relativos. Para ello, se utilizan los valores de CT (*cycle threshold*), correspondientes al número de ciclo de PCR en el cual la fluorescencia detectada se diferencia del ruido de fondo. Este valor es inversamente proporcional a la cantidad de ADN inicial y es característico de cada una de las reacciones.

Para la realización de la RT-qPCR, se utilizó una reacción escalada con un volumen total de 10 µL por pocillo en una placa de 384 pocillos. Para ello, se utilizó 1µL del ADNc obtenido previamente, 5µL de *TaqMan Universal Master Mix II no UNG* (4440040, ThermoFisher Scientific, Walham, MA, EE. UU.) , 3.5µL de agua libre de ARNasas y 1µL de *TaqMan Gene Expression Assays* específico para cada miARN de interés (hsa-

miR-10b-5p (002218), hsa-mir-106b-3p (002380), hsa-mir-106b-5p (000442), hsa-mir-15a-3p (002419), hsa-mir-409-3p (002332), RNU48 (001006); ThermoFisher Scientific, Walham, MA, EE.UU.). Se realizaron triplicados de cada muestra para cada uno de los miARN de interés y se cuantificó en el termociclador QuantStudio 5 (ThermoFisher Scientific, Walham, MA, EE. UU.). El protocolo de amplificación fue el siguiente: un primer paso de 10 minutos a 95°C para la activación de la polimerasa, seguido de 45 ciclos para la amplificación, en los que se mantuvo la temperatura a 95°C durante 15 segundos para disminuirla después a 60°C durante un minuto.

Para el cálculo de la expresión relativa, se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , que permite comparar el CT del miARN problema con el CT del miARN de referencia. En nuestro estudio, se utilizó el RNU48 como miARN de referencia, mediante la ecuación  $2^{-\Delta\Delta CT}$  donde:

$$\Delta\Delta CT = (CT \text{ miRNA interés} - CT \text{ miRNA de referencia}) \text{ muestra interés} \\ - (CT \text{ medio miRNA interés} - CT \text{ medio miRNA referencia}) \text{ muestra referencia}$$

### 3.4 Análisis de rutas reguladas por miARN

Se realizó un enfoque computacional para la predicción de las dianas de los miARN de interés, que ayudó a reducir los posibles candidatos. Para ello, se utilizó el software DIANA-micro T-CDS, al que se accedió desde el servidor web DIANA v5.0 (Paraskevopoulou *et al.*, 2013). Esta herramienta nos muestra si la diana detectada ha sido predicha por las bases de datos miRanda, TargetScan y si se ha validado experimentalmente en TarBase v7.0. Además, se utilizó el paquete de análisis en línea funcional DIANA-miRPath v3.0, para la identificación de los miARN que controlan rutas moleculares significativas anotadas en la Enciclopedia de Genes y Genomas Kyoto (KEGG), empleando como parámetros predeterminados: interacciones experimentalmente compatibles con DIANA TarBase v7.0, un umbral de p-valor de 0.001 y un umbral microT de 0.8. El software TargetScan se utilizó para la predicción de las dianas para los 4 miARN. Para reducir el número de falsos positivos, se aplicó una corrección de la tasa de falso descubrimiento (TFD) de 5% a las rutas KEGG seleccionadas. El algoritmo que se utilizó en este análisis fue una prueba exacta de Fisher de una cola con un p-valor de 0.01 (Vlachos *et al.*, 2015).

### 3.5 Análisis por RT-qPCR del ARNm

En el análisis por RT-qPCR del ARNm se siguió el mismo fundamento que el descrito en el apartado de análisis por RT-qPCR de los miARN. Las diferencias en entre ambos procedimientos se encuentra durante el proceso de la RT-PCR, debido a que en la RT-PCR de miARN se utilizan cebadores específicos y en la del ARNm los cebadores hibridan de forma aleatoria con todo el genoma.

Para ello, se utilizó una placa de 96 pocillos y se añadieron 10µL de la muestra correspondiente de ARNm (200ng de muestra de ARN, completando hasta los 10µL con agua libre de ARNasas) y 10µL de *Master Mix* de RT-PCR (10x *RT buffer* (2µL), 25x *dNTP Mix* 100mM (2µL), 10x cebadores aleatorios (0.8µL), *Multiscribe Reverse Transcriptase* (1µL) y agua libre de nucleasas (4.2µL); 4368814, *High-Capacity cADN Reverse Transcription Kit*, ThermoFisher Scientific, Walham, MA, EE.UU.), obteniendo un volumen total de 20µL en cada uno de los pocillos de la placa de 96. La RT-PCR se realizó en el termociclador 2720 Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific, Walham, MA, EE. UU.), con las siguientes condiciones: un primer periodo de incubación a 25°C durante 10 minutos, que permite la unión de los cebadores aleatorios, seguido de un periodo de 120 minutos a 37°C que permite la síntesis del ADNc y un último periodo de inactivación de 5 minutos a 95°C.

Para la realización de la RT-qPCR, se utilizó una reacción escalada con un volumen total de 10 µL por pocillo en una placa de 384 pocillos. Para ello, se utilizó 1µL del ADNc obtenido previamente, 5µL de *TaqMan Universal Master Mix* (4304437, ThermoFisher Scientific, Walham, MA, EE.UU.) , 3.5µL de agua libre de ARNasas y 1µL de *TaqMan Gene Expression Assays* específico para cada gen de interés (FBX32 (Hs01041408\_m1), GPX4 (Hs00989766\_g1), ACSL4 (Hs00244871\_m1), GSS (Hs00609286\_m1), GCLC (Hs00155249\_m1), GCLM (Hs00978072\_m1), GAPDH (Hs02786624\_g1); ThermoFisher Scientific, Walham, MA, EE. UU.). Se realizaron triplicados de cada muestra para cada uno de los genes de interés y se cuantificó en el termociclador *QuantStudio 5* (ThermoFisher Scientific, Walham, MA, EE. UU.). El protocolo de amplificación fue el siguiente: un primer paso de 10 minutos a 95°C para la activación de la polimerasa, seguido de 40 ciclos para la amplificación, en los que se mantuvo la temperatura a 95°C durante 15 segundos para disminuirla después a 60°C durante un minuto.

Para el cálculo de la expresión relativa, se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , que permite comparar el CT del gene problema con el CT del gene de referencia. En nuestro estudio, se utilizó el GAPDH como gen de referencia, mediante la ecuación  $2^{-\Delta\Delta CT}$  dónde:

$$\Delta\Delta CT = (CT_{\text{gen interés}} - CT_{\text{gen referencia}})_{\text{muestra interés}} - (CT_{\text{medio gen interés}} - CT_{\text{medio gen referencia}})_{\text{muestra control}}$$

### 3.6 Extracción de proteínas

La obtención de los extractos se realizó con el objetivo de obtener las proteínas totales. Para la extracción de las proteínas se lisaron aproximadamente  $1.5 \cdot 10^6$  células. Para ello, se eliminó el medio de cultivo que contenían los frascos con las células, se realizaron dos lavados con 5mL de PBS y se añadió 3mL de tripsina. Se dejaron incubar durante 5 minutos a 37°C, pasado este tiempo se añadió 5mL de DMEM/F-12 suplementado, para inhibir la acción de la tripsina. Se recogió el contenido de cada frasco en tubos y se centrifugaron durante 5 a 1.500rpm a 25°C, después se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 5mL DE PBS y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones descritas anteriormente. Al finalizar la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 150µL de tampón de lisis total (Hepes pH 7.4, 20mM; Triton X-100 1%; NaCl 100mM; NaF 50mM; β-glicerofosfato 10mM; 10µL/mL Ortovanadato de sodio activado 1mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1mM; Inhibidor de proteasas 2µL/mL), y se dejaron incubar durante 15 minutos a 4°C. Pasado este tiempo, las muestras se agitaron durante 30 segundos y se centrifugaron a 13.000g durante 10 minutos a 4°C. Una vez centrifugado, se recogió el sobrenadante en un tubo nuevo y se guardó en el congelador a -20°C, para su posterior uso.

### 3.7 Cuantificación de las proteínas por el método Bradford

La concentración de las proteínas de cada una de las muestras se determinó mediante el método colorimétrico denominado método de Bradford. Para la cuantificación se utilizó una placa de 96 pocillos, en cada pocillo se añadió 199µL de reactivo de Bradford diluido (1:5) con agua MiliQ, 1µL de cada una de las muestras de interés o 1µL de una serie de muestras de concentración conocida (0, 0.25, 0.5, 1 y 2 mg/mL) de suero bovino fetal (SBF), para obtener la recta patrón. La placa con los compuestos se dejó incubar durante 5 minutos en la oscuridad, y seguidamente se procedió a su lectura en el

espectrofotómetro *SpectraMax® Plus 384 Microplate Reader* (Molecular Devices, San José, CA, EE. UU.) a una longitud de onda de 595nm.

A partir de los valores de absorbancia de las muestras de concentración conocida, se generó una recta patrón relacionando absorbancia y concentración. Los valores de concentración de las muestras problemas, se determinaron a partir de la ecuación de dicha recta.

### **3.8 Análisis de la expresión de proteínas por Western-Blot**

La detección específica de las proteínas presentes en los extractos obtenidos se realizó mediante la técnica Western-Blot. Esta técnica permite la identificación de proteínas específicas, mediante la unión antígeno-anticuerpo, en extractos proteicos complejos procedentes de células, tejidos o fluidos biológicos.

Para la detección de las proteínas de interés, se requiere la separación de estas previamente según su peso molecular mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Cada una de las muestras se preparó ajustando las cantidades de muestra y agua bidestilada, para ajustar la cantidad de muestra a 15µg en 20µL de volumen. Además, se añadió 5µL de tampón de carga (Tris 40mM, EDTA, azul de bromofenol 0,01%, sacarosa 40%, SDS 4%, β-mercaptoetanol 10%) a cada una de las muestras, obteniendo un volumen final de 25µL. Tras su preparación, se calentaron las muestras 5 minutos a 95°C, para desnaturalizar las proteínas, y se procedió a la carga de las muestras de proteína en el gel de poliacrilamida al 12,5% (agua MiliQ 3,23mL, mix de acrilamida 2,52 mL, Tris 1.5M pH 8.8 2,08mL, SDS 10% 0,1mL, APS 10% 160µL y TEMED 9,6µL) dentro de una cubeta de electroforesis horizontal (BIORAD MiniPROTEAN Tetra cell, Hercules, CA, EE. UU.) con tampón tris-glicina SDS (1610772, BIORAD, Hercules, CA, EE. UU.), dejándose correr a un voltaje de 80V hasta que la muestra consigue entrar en los pocillos y después a un voltaje constante de 120V durante aproximadamente 2 horas.

Transcurrida la electroforesis, se procedió a realizar la transferencia de las proteínas del gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa (10600002, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, EE. UU.) para llevar acabo allí la detección específica con anticuerpos. Para ello, se utilizó el tampón de transferencia 1x Tris/Glicina con metanol

al 20% (1610771, BIORAD, Hercules, CA, EE. UU.) y un voltaje constante de 120V durante 1 hora a 4°C.

Tras la transferencia, el gel fue separado cuidadosamente de la membrana y dejó teñir con solución azul de *Coomassie* (*Coomassie* R-250 1.25g (42660, Merck Milipore, Burlington, MA, EE. UU.), etanol absoluto 250mL, ácido acético 50mL y agua bidestilada 1200mL), para posteriormente desteñirlo mediante lavados con agua. Por otro lado, la membrana se sumergió en la solución de bloqueo (SBF 5% en *TBS-Tween* (Tris 20mM, NaCl 137mM, pH 7.6, *Tween* 0.1%)) durante una hora a temperatura ambiente. El bloqueo impide la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana para poder detectar así únicamente las proteínas de interés.

Una vez transcurrido el tiempo del bloqueo, se procedió a la detección de las proteínas mediante el uso de anticuerpos primarios contra FBXO32 (1:1000; ab168372, Abcam, Cambridge, Reino Unido), GPX4 (1:1000; ab125066, Abcam, Cambridge, Reino Unido), ACSL4 (1:1000; ab155282, Abcam, Cambridge, Reino Unido) y  $\beta$ -Actina (1:10000; A1978, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.), esta última se utilizó como control de carga. Los anticuerpos se diluyeron en *TBS-Tween 0.1%* con SBF al 1%, y se dejaron incubando durante toda la noche a una temperatura de 4°C en agitación suave.

Al día siguiente se lavaron las membranas tres veces en *TBS-Tween 0.1%* con SBF al 1%, para eliminar el exceso de anticuerpo no unido a la membrana. Tras los lavados, se incubó la membrana durante una hora en agitación suave con los anticuerpos secundarios contra Ig de ratón (1:7500; GENA931-100UL, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.) o Ig de conejo (1:10000; #7074, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, EE. UU.), ambos conjugados con la enzima peroxidasa de rábano.

Tras la segunda incubación, se realizaron tres lavados con *TBS-Tween 0.1%* y se procedió a la detección quimioluminiscente. Para ello, las membranas se incubaron en la oscuridad con 1mL de la mezcla 1:1 de los reactivos del kit de revelado (ECLTM Western Blotting Detection Reagents, Amersham GE HealthcareBio-Science AB, Uppsala, Suecia) y tras 1 minuto de incubación se detectó la señal quimioluminiscente utilizando el escáner densitométrico (LAS-4000, General Electrics).

### 3.9 Análisis de la densitometría

Las imágenes obtenidas de la luminiscencia que contenían la expresión de las proteínas de interés fueron analizadas con el software de análisis de imágenes *Image J* (Schneider, Rasband y Eliceiri, 2012). La intensidad relativa de las bandas se obtuvo utilizando la herramienta del rectángulo para permitía definir el área de las bandas. Las secciones rectangulares que contenían las regiones de interés se definieron como la mínima área que incluye las bandas de interés en un rectángulo. Las regiones de interés se analizaron mediante la opción *Gels* en el menú *Analyze* del software *Image J*, obteniéndose un histograma para cada rectángulo. Los picos observados en el histograma, para cada rectángulo, corresponden a cada banda que encierra el rectángulo. Cada pico contenía un valor de área que se corresponde con el número de píxeles y la intensidad, éste se midió con la herramienta *Wand* del *Image J*. Estos datos sobre áreas se usaron para detectar diferencias entre intensidades y, en resultado, con la cantidad de proteína.

### 3.10 Determinación del cociente glutatión oxidado (GSSG)/ glutatión reducido (GSH)

Los niveles de GSSG/GSH se estudiaron empleando el kit *The DetectX Glutathione kit* (Arbor Assays, Ann Arbor, MI, EE.UU.), que permite la del glutatión mediante fluorescencia. Para ello, se cultivaron las células en placas de 6 pocillos hasta que tuvieron una confluencia del 80%, mediante el procedimiento descrito anteriormente. Las placas con las células se pusieron las placas sobre hielo (4°C), y se realizaron dos lavados con 1mL de PBS frío. Seguidamente, se añadieron 120µL de ácido 5-sulfosalicílico frío al 5% por pocillo, se rasparon con un raspador lo que permitió la ruptura mecánica de las células y la agregación de las proteínas. Las muestras se recogieron en su correspondiente tubo, dejándose incubar a 4°C durante 10 minutos y agitando las muestras cada 3 minutos, pasado el tiempo se centrifugaron durante 10 minutos a 14000 *rpm* y una temperatura de 4°C. Tras la centrifugación, el sobrenadante que contenía el GSH y el GSSG se trasvasó a un tubo nuevo, registrando los volúmenes recogidos, y los sedimentos, que contenían las proteínas, se guardaron para cuantificar posteriormente. El sobrenadante se diluyó 1:5 con *Assay Buffer*, añadimos 4 veces el volumen del sobrenadante. A continuación, se preparó una placa de 96 pocillos y

añadieron 50µL de las muestras diluidas, estándares y controles (C+: 5µL de *Oxidized Glutathione Control* + 245µL *Sample Diluent*) respectivamente en los pocillos de la placa. Añadimos 25µL de *ThioStar Reagent* a cada pocillo y agitamos la placa para mezclar los compuestos, dejamos incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se procedió a la lectura en el espectrofluorímetro *Spectra Max GEMINI XPS* (Molecular Devices, San Jose, CA, EE. UU.), con una excitación de 370-410nm, y una emisión de 510nm, para determinar los niveles de GSH libre.

Una vez leído el GSH libre, se añadieron 25µL del *Reaction Mixture* a cada uno de los pocillos (*Reaction Mixture: NADPH Concentrate* 150µL + *Glut Red Conc* 150µL + *Assay Buffer* 1200µL). Agitamos la placa para mezclar los compuestos y dejamos incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Pasado el tiempo, se leyó de nuevo en el espectrofluorímetro *Spectra Max GEMINI XPS* (Molecular Devices, San Jose, EE. UU.) con una excitación de 370-491nm y una emisión de 510nm, para determinar el nivel de GSH total. Por último, a partir de la recta patrón generado con los estándares, se obtuvieron los resultados de los niveles de GSH total y GSH libre.

La cantidad de GSSG, 1 mol de GSSG está formado por 2 moles de GSH, se determina mediante la siguiente fórmula:

$$GSSG = \frac{GSH \text{ libre} - GSH \text{ total}}{2}$$

Para la obtención del ratio GSSG/GSH, se dividieron los valores correspondientes a ambas medidas, y se multiplicaron por 100.

### 3.11 Análisis estadísticos

En el análisis estadístico de los resultados, se tomó la media aritmética como medida de la tendencia principal y la desviación estándar (DE) se tomó como medida de la dispersión. Al tratarse de muestras independientes, y no presentar normalidad (no paramétrico) debido a que la n es muy baja, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis ("Kruskal-Wallis Test", 2008), que permitía la comparación entre los diferentes grupos. El tamaño de la muestra utilizado en cada subgrupo para la determinación analítica fue de n=3, se asumieron diferencias estadísticas cuando el p-valor de la prueba de comparación adecuado estaba por debajo de 0.05.

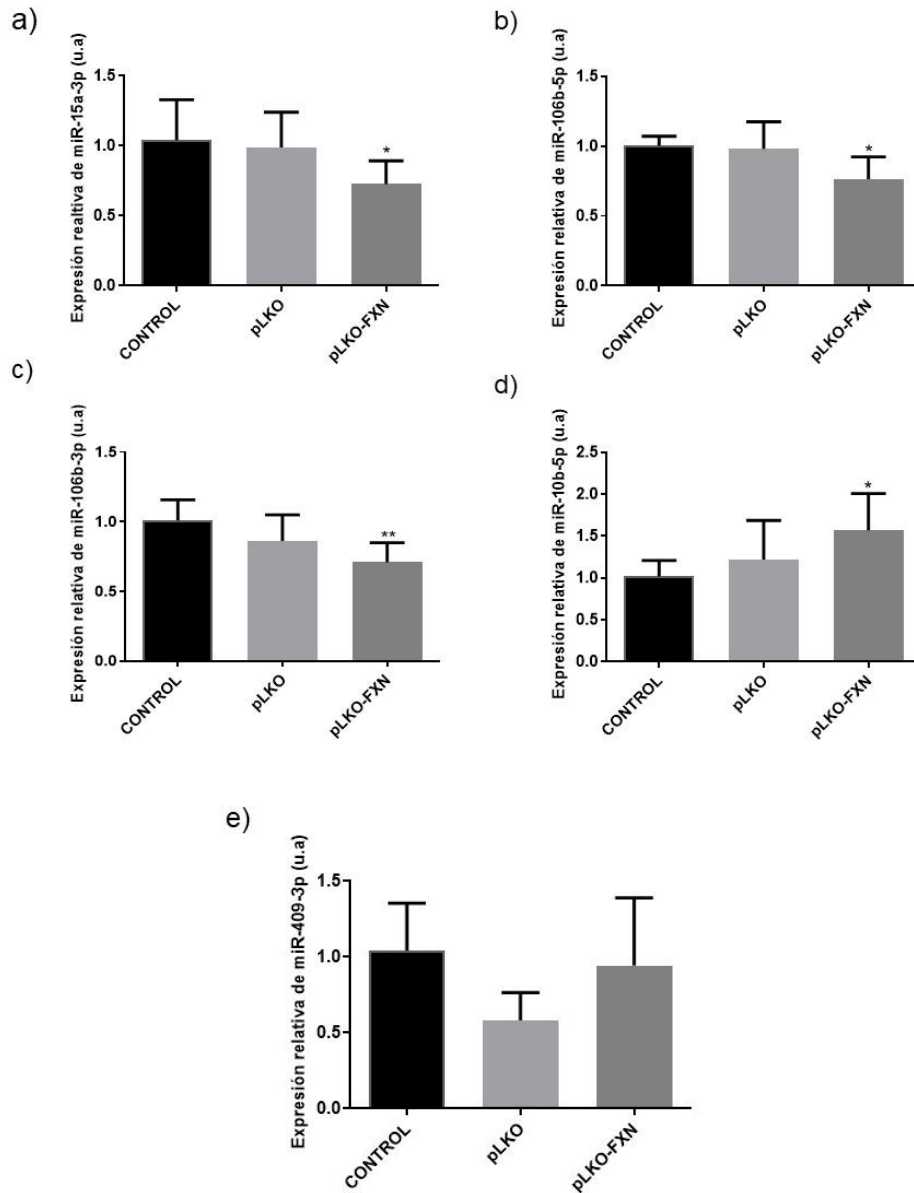


## 4. Resultados

---

### 4.1 La reducción de los niveles de FXN produce cambios en el perfil de expresión de los miARN

En los resultados obtenidos de los análisis de secuenciación de ARN pequeños realizados previamente por el grupo de investigación, identificaron un perfil de expresión diferencial de miARN entre los modelos celulares con déficit de frataxina (pLKO-FXN) respecto al modelo control. Para identificar la relevancia de estos miARN, como potenciales contribuidores en los mecanismos de la fisiopatología de la FRDA, se realizaron análisis de validación de los miARN por RT-qPCR en los modelos celulares deficientes en frataxina. De acuerdo con los resultados de secuenciación de los miARN, se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de los micros miR-15a-3p, miR-10b-5p, miR-106b-3p, miR-106b-5p y miR-409-3p. Los resultados obtenidos en la validación, mediante RT-qPCR, mostraron que los miARN miR-15a-3p, miR-106b-5p y miR-106b-3p tenían niveles de expresión reducidos en los modelos celulares deficientes en frataxina (pLKO-FXN) respecto al grupo control (**Figura 7a, 7b y 7c, respectivamente**). Por otro lado, se observó que los niveles de expresión de miR-10b-5p eran superiores en el grupo pLKO-FXN respecto al grupo control (**Figura 7d**). Finalmente, el miR-409-3p no mostró diferencias en la expresión en el modelo pLKO-FXN respecto al grupo control (**Figura 7e**). Estos resultados evidencian que la disminución en los niveles de frataxina, produce una alteración en los perfiles de los miARN de los modelos celulares de pLKO-FXN.



**Figura 7. Validación de los niveles de expresión relativa de los miARN obtenidos en el análisis de secuenciación de los ARN pequeños.** Representación gráfica de los a) niveles de expresión relativa del miR-15a-3p; b) niveles de expresión relativa del miR-10b-5p; c) niveles de expresión relativa del miR-106b-3p; d) niveles de expresión relativa del miR-106b-5p; y e) niveles de expresión relativa del miR-409-3p. La expresión se comparó respecto al control endógeno RNU48, en las células SH-SY5Y control (n=3), pLKO control (n=3), y las líneas celulares deficientes en frataxina pLKO-FXN (pLKO-138.1 n= 3 y 138.2 n=3). Resultados obtenidos por RT-qPCR y calculados mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Todos los resultados se muestran en unidades arbitrarias (u.a) y se representaron como la media $\pm$ DE. \* Indica p-valor<0.05 y \*\* indica p-valor<0.01 respecto al grupo control.

## 4.2 El perfil de los miARN obtenidos tiene como diana las rutas del metabolismo de FoxO, de los ácidos grasos y del estrés oxidativo

En el estudio de las posibles dianas reguladas por los miARN validados anteriormente se utilizó el software DIANA-micro T-CDS, al que se accedió desde el servidor web DIANA v5.0. Concretamente se empleó el paquete de análisis en línea funcional DIANA-miRPath v3.0. Mediante dicho software se identificaron diferentes rutas moleculares (**Tabla 1**) y procesos biológicos (**Tabla 2**), regulados por los miARN validados mediante RT-qPCR y con relación fisiológica en la ataxia de Friedreich.

**Tabla 1.** Rutas moleculares KEGG obtenidas que son reguladas por los miARN validados en los modelos celulares deficientes en frataxina.

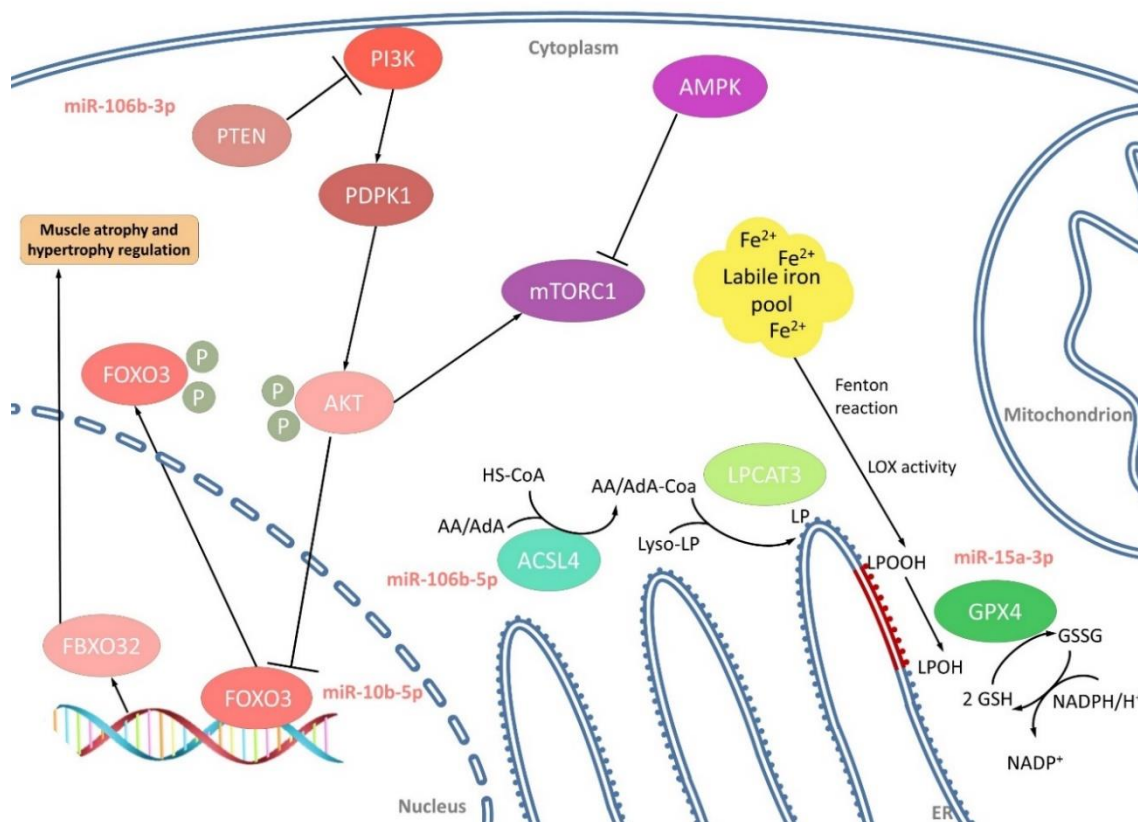
<i>Ruta KEGG</i>	<b>Código KEGG</b>	<b>p-valor</b>
<i>Biosíntesis de ácidos grasos</i>	hsa00061	1.06201805701e-12
<i>Vía de señalización TGF-β</i>	hsa04350	1.52576694359e-05
<i>Procesado de proteínas en retículo endoplásmico</i>	hsa04141	8.38986831555e-05
<i>Vía de señalización de la neutrofina</i>	hsa04722	0.000505811389514
<i>Vía de señalización Hippo</i>	hsa04390	0.000532393165824
<i>Vía de señalización AMPK</i>	hsa04152	0.000589811006189
<i>Vía de señalización FoxO</i>	hsa04068	0.000681448691788
<i>Vía de señalización p53</i>	hsa04115	0.00209277360571
<i>Vía de señalización de la insulina</i>	hsa04910	0.00795938562102
<i>Vía de señalización mTOR</i>	hsa04150	0.0255301269662
<i>Vía de señalización MAPK</i>	hsa04010	0.0380572038367

**Tabla 2.** Procesos biológicos GO obtenidos que son regulados por los miARN validados en los modelos celulares deficientes en frataxina.

<b>Categoría de GO</b>	<b>Código GO</b>	<b>p-valor</b>
<i>Respuesta al estrés oxidativo</i>	0006950	2.87573570272e-26
<i>Procesos metabólicos de pequeñas moléculas</i>	0044281	2.80462032169e-22
<i>Vía de señalización del receptor de neurotrofina (TRK)</i>	0048011	3.56585787671e-22
<i>Muerte celular</i>	0008219	3.04792541427e-19
<i>Vía de señalización del receptor de la insulina</i>	0008286	2.94546116096e-08
<i>Regulación positiva de la inserción de proteínas en la membrana mitocondrial implicada en la vía de señalización apoptótica</i>	1900740	2.84914564481e-07

En este análisis, se identificó que el miR-106b-3p regula a la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), implicada en la vía de la proteína quinasa B (AKT). Esta a su vez inactiva al factor de transcripción FOXO3A, el cual se observó que estaba regulado por el miR-10b-5p. Estas proteínas intervienen en la ruta de señalización FoxO y la ruta de señalización de la insulina (**Tablas 1 y 2, respectivamente**). Además, se ha observado que FOXO3A está implicada en la regulación de la expresión de la Atrogina-1, codificada por el gen *FBXO32* (Sandri *et al.*, 2004), asociada con la muerte neuronal y la atrofia muscular característica de la FRDA (**Figura 8**).

Por otro lado, se encontró que miR-106b-5p regula al miembro 4 de la familia de acil-CoA sintetasa de cadena larga (ACSL4) y, por tanto, interviene en la ruta molecular del metabolismo de los ácidos grasos, identificada en los resultados de rutas KEGG (**Tabla 1**). La Glutación Peroxidasa 4 (GPX4) es regulada por el miR-15a-3p, por lo que este podría estar implicado en la regulación de la vía molecular de respuesta al estrés oxidativo, identificada en los resultados de las categorías GO (**Tabla 2**). Además, tanto la ACSL4 como GPX4 se han observado implicadas en el proceso de muerte celular programada conocido como ferroptosis (Seiler *et al.*, 2008; Doll *et al.*, 2017) (**Figura 8**).

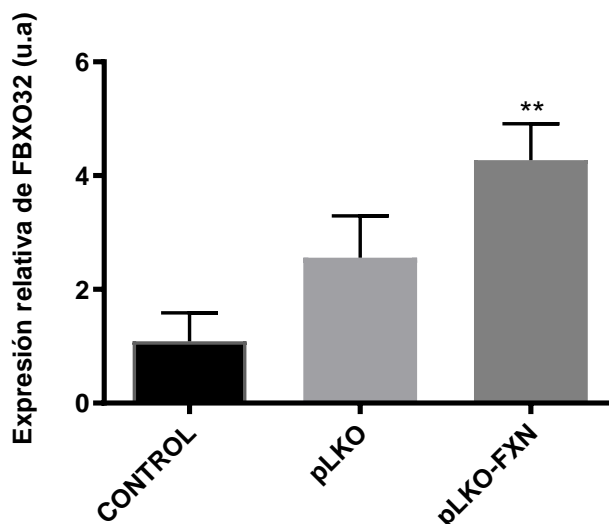


**Figura 8. Representación gráfica de los diferentes genes diana y de las rutas reguladas por los miARN obtenidos con expresión diferencial.** El gen diana *PTEN* se ve regulado por miR-106b-3p; el gen *FOXO3* se ve regulado por miR-10b-5p; el gen *ACSL4* se ve regulado por miR-106b-5p; y el gen *GPX4* se ve regulado por miR-15a-3p. Estos genes regulados por los miARN, se encuentran implicados en las vías moleculares como la ruta de señalización FOXO, la ruta molecular del metabolismo de los ácidos grasos y la vía molecular de respuesta al estrés oxidativo, respectivamente. Las dianas genicas y las rutas moleculares han sido identificadas en las bases de datos KEGG y GO. Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (*PTEN*), Factor de transcripción (*FOXO3*), miembro 4 de la familia de acil-CoA sintetasa de cadena larga (*ACSL4*), Glutatión Peroxidasa 4 (*GPX4*).

### 4.3 Los niveles de Atrogina-1 se ven elevados en los modelos deficientes en frataxina

Una de las rutas KEGG que se encontraba alterada en los modelos era la de FoxO. Por ello, se evaluaron los niveles de *FBXO32*, que codifica para la proteína Atrogina-1. Se trata de una proteína caja-F que participa como componente principal en la atrofia del músculo esquelético. Para ello, participa en la vía ubiquitina proteasoma y su expresión se eleva significativamente en presencia de atrofia muscular (Gomes, Lecker, Jagoe, Navon y Goldberg, 2001).

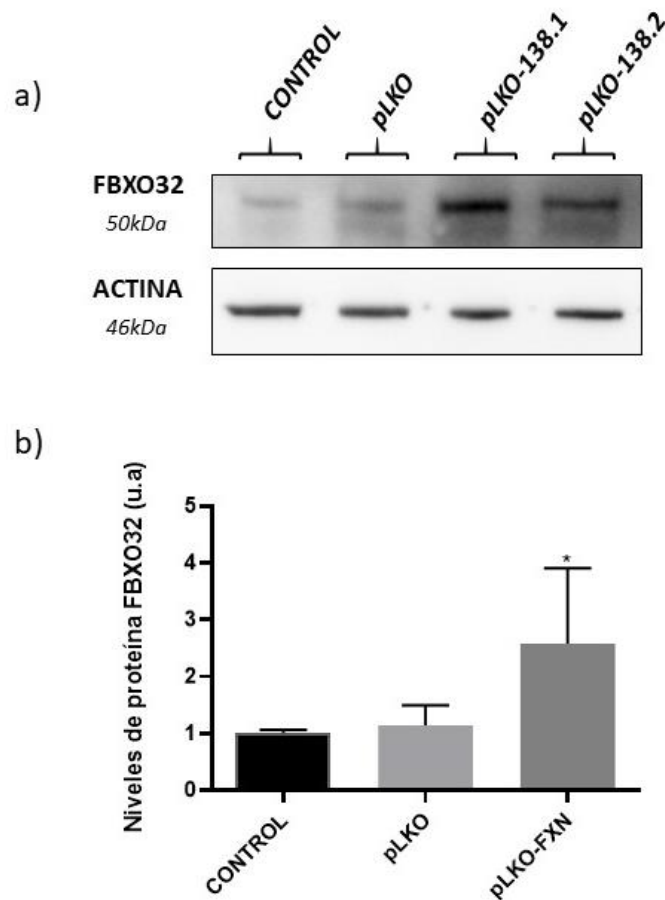
Como se ha visto anteriormente, la expresión de la proteína atrogina-1 o FBXO32 está regulada por el factor de transcripción FOXO3A, involucrado en la regulación de vías como la atrofia muscular o la hipertrofia. FOXO3A es una de las dianas de los miARN validados, en concreto, del miR-10b-5p. Por lo que la desregulación de la expresión de dicho factor de transcripción podría afectar de manera directa a la expresión de la proteína atrogina-1. Además, FOXO3A también está regulada a través de AKT por medio de PTEN, y ésta es una de las dianas del miARN miR-106b-3p. Por ello, se realizó un análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR. Los resultados obtenidos, mostraron una mayor expresión de Atrogina-1 en los modelos celulares deficientes en frataxina (pLKO-FXN) respecto al grupo control (**Figura 9**).



**Figura 9. Expresión relativa del gen *FBXO32*.** Representación gráfica de los niveles del ARNm de *FBXO32* en las células SH-SY5Y control (n=3), pLKO control (n=3), y las líneas celulares deficientes en frataxina pLKO-FXN (pLKO-138.1 n= 3 y 138.2 n=3). Resultados obtenidos por RT-qPCR y calculados mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , empleando como gen de referencia el *GAPDH*. Los resultados se muestran en unidades arbitrarias (u.a) y se representaron como la media $\pm$ DE. \* Indica p-valor<0.05 y \*\* indica p-valor<0.01 respecto al grupo control.

Para confirmar si los niveles de expresión génica aumentados del gen *FBXO32* se observaban también a nivel proteico, se realizó un análisis por Western-Blot en los diferentes modelos celulares. Los resultados obtenidos en la expresión proteica mostraron un aumento significativo de la expresión de la proteína atrogina-1 respecto al

grupo control (**Figura 10a-b**), lo que sugiere que ésta podría estar implicada en los mecanismos fisiopatológicos de la FRDA.

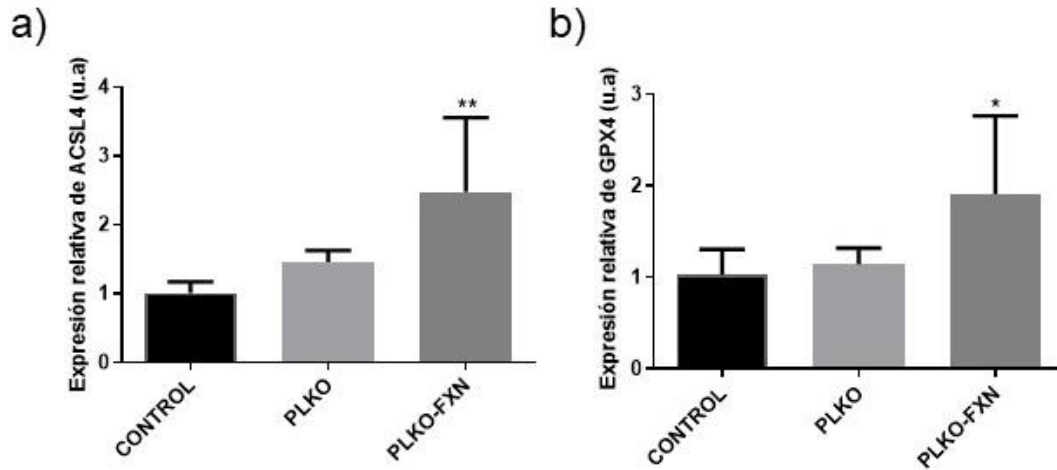


**Figura 10. Niveles de la proteína FBXO32 mediante análisis WB.** a) Imagen representativa de Western-Blot de los niveles de la proteína Atrogina-1. b) Representación gráfica de los niveles relativos de la proteína Atrogina-1 obtenidos por densitometría del Western-Blot. La expresión se comparó con la proteína de referencia  $\beta$ -Actina, las líneas celulares deficientes en frataxina pLKO-FXN (pLKO-138.1 n= 3 y 138.2 n=3) y el grupo control (n=3). Los resultados se muestran en unidades arbitrarias (u.a) y se representaron como la media $\pm$ DE. \* Indica p-valor<0.05 respecto al grupo control.

#### 4.4 La proteína Glutación peroxidasa 4 se encuentra alterada en los modelos deficientes de frataxina

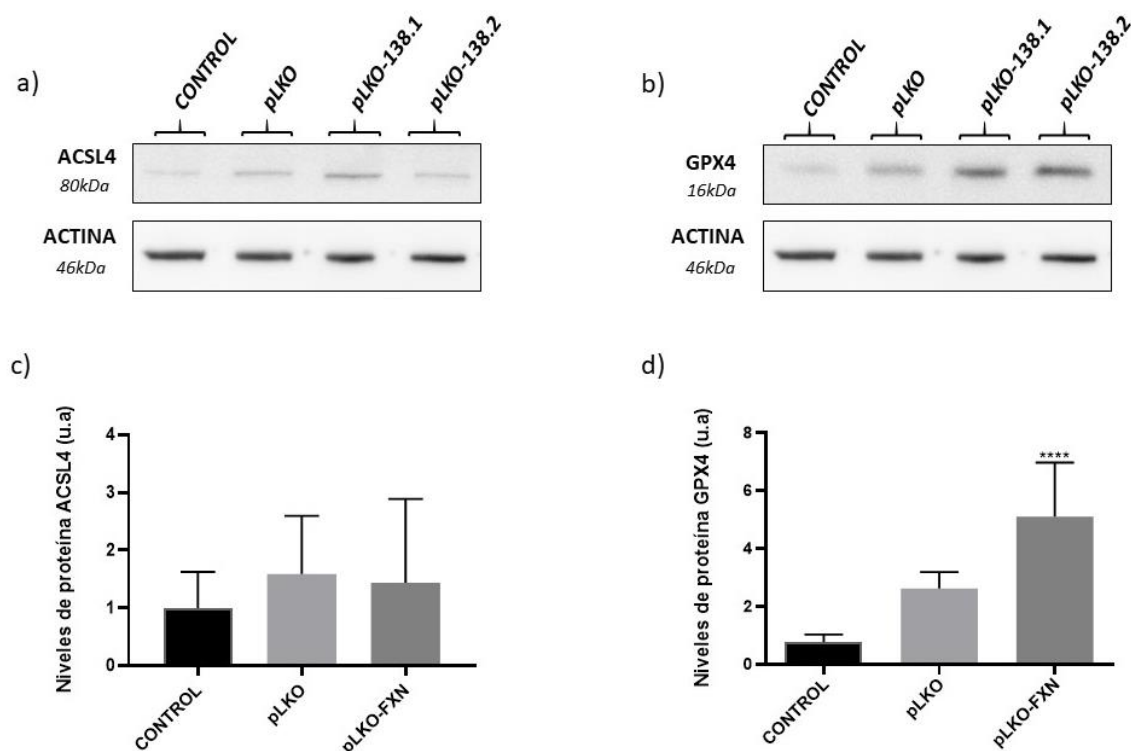
Con la finalidad de evaluar los niveles de expresión de los genes de las proteínas diana de los miARN validados implicadas en las rutas de ferroptosis de la FRDA, se determinaron también los niveles de expresión génica relativa mediante RT-qPCR. Recordemos que el miR-106b-5p regula al gen ACSL4 y el miR-15a-3p regula al gen GPX4. Los resultados obtenidos, mostraron un aumento significativo de la expresión del

gen *ACSL4* (**Figura 11a**) y del gen *GPX4* (**Figura 11b**) en las líneas deficientes de frataxina, respecto al grupo control. Indicando que las vías reguladas por las proteínas codificadas por dichos genes podrían estar alteradas.



**Figura 11. Niveles de expresión relativa de los genes diana de los diferentes miARN.** Representación gráfica de los niveles de expresión génica de a) Miembro 4 de la familia de acil-CoA de cadena larga (*ACSL4*); y b) Glutatión Peroxidasa 4 (*GPX4*); en las células control (n=3) y las líneas celulares deficientes en frataxina pLKO-FXN (pLKO-138.1 n= 3 y 138.2 n=3). Resultados obtenidos por RT-qPCR y calculados mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , empleando como gen de referencia el *GAPDH*. Todos los resultados se muestran en unidades arbitrarias (u.a) y se representaron como la media $\pm$ DE. \* Indica p-valor<0.05 y \*\* indica p-valor<0.01 respecto al grupo control.

Para evaluar si los niveles de expresión génica se correspondían con los niveles de proteína, se realizó un análisis de expresión proteica por Western-Blot en los modelos celulares deficientes en frataxina. En los resultados obtenidos, la proteína ACSL4 no mostró diferencias significativas respecto al grupo control (**Figuras 12a y 12c**). Por otro lado, se observó un aumento significativo de la expresión de la proteína GPX4 en los modelos deficientes en frataxina respecto al grupo control, correlacionando con los resultados obtenidos en la expresión génica (**Figuras 12b y 12d**). Estos resultados manifiestan el papel de la GPX4 en la FRDA, y más específicamente en la ruta de muerte celular a través de la ferroptosis, ya que es una de las proteínas más importantes involucradas en esta ruta.

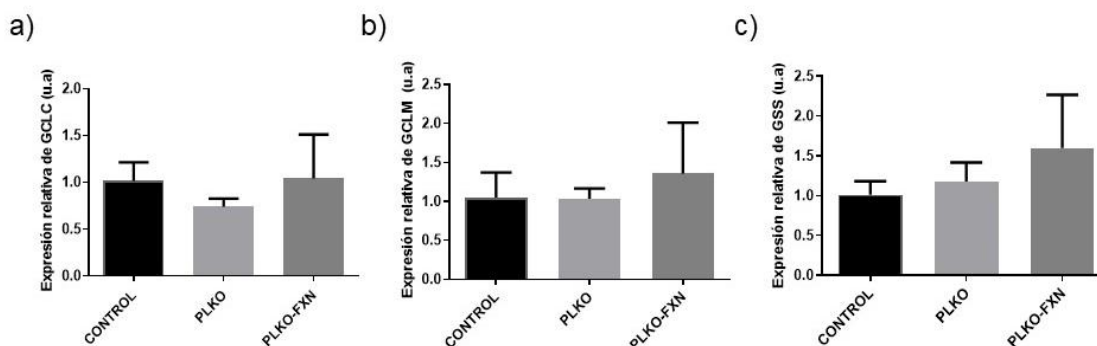


**Figura 12. Niveles de las proteínas ACSL4 y GPX4 mediante análisis WB.** a) Imagen representativa de Western-Blot de los niveles de la proteína ACSL4 y Actina (proteína de referencia) en las líneas celulares deficientes en frataxina pLKO-FXN (pLKO-138.1 n= 3 y 138.2 n=3) y el grupo control (n=3); b) Imagen representativa de Western-Blot de los niveles de la proteína GPX4 y Actina en las líneas celulares deficientes en frataxina pLKO-FXN (pLKO-138.1 n= 3 y 138.2 n=3) y el grupo control (n=3); c) Representación gráfica de la densitometría de las imágenes de WB de ACSL4; y d) Representación gráfica de la densitometría de las imágenes de WB de GPX4 para las líneas celulares deficientes en frataxina pLKO-FXN (pLKO-138.1 n= 3 y 138.2 n=3) respecto al grupo control. Todos los resultados se muestran en unidades arbitrarias (u.a) y se representaron como la media±DE. \*\*\*\* Indica p-valor<0.0001 respecto al grupo control.

#### 4.5 Los modelos deficientes en frataxina presentan mayores niveles de glutatión oxidado

Uno de los procesos biológicos que se observó alterado por los miARN fue el estrés oxidativo. Por tanto, era de interés observar el papel de los agentes antioxidantes celulares. El principal agente antioxidante celular, además de haberse observado involucrado en la FRDA, es el glutatión (GSH). En la síntesis biológica del glutatión intervienen dos enzimas fundamentales la Glutamato-Cisteína Ligasa (GCL), constituida

por dos subunidades la catalítica (GCLC) y la modificadora (GCLM), y la Glutación Sintasa (GSS) (Franklin *et al.*, 2009). Por ello, se analizaron los niveles de expresión relativa de los genes codificantes para dichas enzimas. Los resultados obtenidos por RT-qPCR, no mostraron diferencias significativas en los niveles de expresión respecto al grupo control en ninguno de ellos (**Figuras 13a, 13b y 13c**).

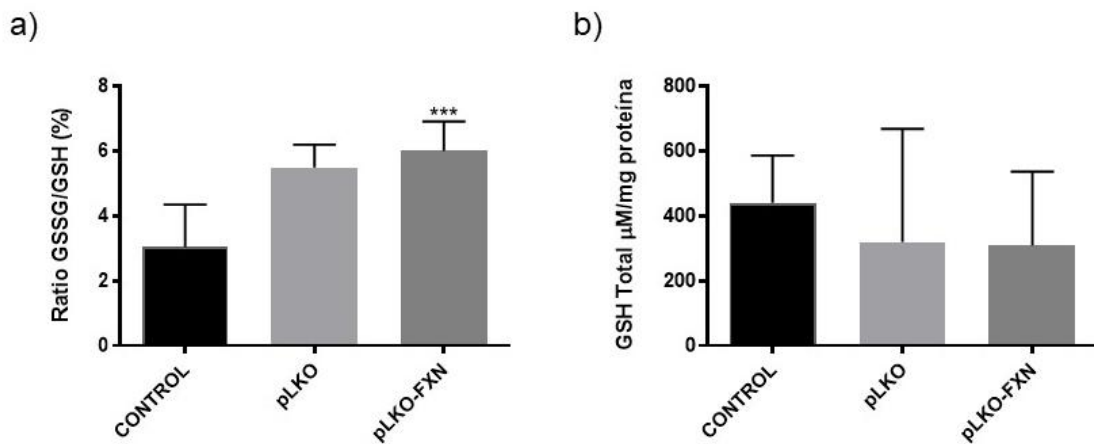


**Figura 13. Niveles de expresión relativa de los genes diana de los miARN, implicados en la síntesis del GSH.** Representación gráfica de los niveles de expresión génica de a) Subunidad catalítica Glutamato-Cisteína ligasa (*GCLC*); b) Subunidad modificadora Glutamato-Cisteína ligasa (*GCLM*); y c) Glutación Sintetasa (*GSS*); en las células control (n=3) y las líneas celulares deficientes en frataxina pLKO-FXN (pLKO-138.1 n= 3 y 138.2 n=3). Resultados obtenidos por RT-qPCR y calculados mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , empleando como gen de referencia el *GAPDH*. Todos los resultados se muestran en unidades arbitrarias (u.a) y se representaron como la media $\pm$ DE.

El GSH es capaz de reducir los niveles de  $H_2O_2$  cuando la GPX lo utiliza como agente reductor para generar  $H_2O$ . El GSH reducido reacciona con otra molécula de GSH generando la forma oxidada GSSG. La reducción de GSSG a GSH se realiza mediante la glutación reductasa, que obtiene los electrones del NADPH generando una molécula de  $NADP^+$ . Además, la glutación S-transferasa cataliza la adición nucleofílica de GSH a los electrófilos. Por tanto, la relación GSSG/GSH se considera un buen parámetro para medir el desequilibrio del estrés oxidativo.

Para el estudio de los niveles del GSH, se empleó el kit “The DetectX Glutathione kit” para analizar el perfil de estrés oxidativo de los cultivos celulares. En los resultados obtenidos el ratio de GSSG/GSH aparece aumentado de manera significativa en las líneas celulares deficientes en frataxina (pLKO-138.1 y pLKO-138.2) respecto al grupo control (**Figura 14a**). Otro parámetro evaluado fue la cantidad de proteína de GSH total,

aunque no se observaron diferencias significativas en las líneas celulares deficientes en frataxina (pLKO-138.1 y pLKO-138.2), respecto al grupo control (**Figura 14b**). Estos valores de GSH total, correlacionan con los obtenidos en la expresión génica de las enzimas de síntesis del GSH donde tampoco se observó un aumento en la expresión (**Figura 13**). Los resultados obtenidos en el ratio GSSG/GSH evidencian que hay una mayor oxidación del GSH en dichos modelos celulares e indican la presencia de estrés oxidativo. Además, este estrés oxidativo es uno de los componentes claves en el proceso de muerte por ferroptosis.



**Figura 14. Niveles de GSH.** a) Representación gráfica del ratio entre el glutatión oxidado (GSSG) y el reducido (GSH) expresado en porcentaje (%) en las células control (n=3) y las líneas celulares deficientes en frataxina pLKO-FXN (pLKO-138.1 n= 3 y 138.2 n=3). b) Representación gráfica de la cantidad total de proteína GSH expresada en unidades de concentración (µM/mg) en las células control (n=3) y las líneas celulares deficientes en frataxina pLKO-FXN (pLKO-138.1 n= 3 y 138.2 n=3). Los resultados se representan como media±DE. \*\*\* Indica p-valor<0.001 respecto al grupo control.



## 5. Discusión

---

La ataxia de Friedreich es una enfermedad neurodegenerativa rara autosómica recesiva que afecta principalmente al sistema nervioso central y periférico. Además, presenta enfermedades concomitantes como son problemas en el esqueleto, el corazón o el sistema endocrino (Bidichandani y Delatycki, 1998). Uno de los principales problemas que presenta la FRDA es su alta heterogeneidad fenotípica. Se ha observado que pacientes con el mismo número de repeticiones del triplete de nucleótidos presentan diferentes rasgos fenotípicos, incluso gemelos con las mismas mutaciones, no tienen la misma afección. Otro problema que presenta la FRDA es la ausencia de marcadores de pronóstico y seguimiento de ensayos clínicos fiables. Por ello, es más que evidente la necesidad de investigación en este campo.

El papel de los miARN ha cobrado cada vez un mayor interés en el área de las enfermedades neuromusculares (Alexander y Kunkel, 2015) y cardiovasculares (van Rooij y Olson, 2012). Estudios previos en nuestro laboratorio, identificaron al miR-323-3p como biomarcador de la cardiomiopatía hipertrófica e indicador de la variabilidad fenotípica de pacientes con la FRDA (Seco-Cervera *et al.*, 2017). Además, como se ha comentado previamente, la genética no está relacionada con los rasgos fenotípicos por lo que el estudio de la epigenética a través de los miARN puede ayudar a comprender mejor la fisiopatología de la FRDA. Por ello, resulta interesante identificar biomarcadores que puedan relacionar los rasgos fenotípicos y servir como pronóstico de la FRDA.

Además, resulta especialmente interesante la realización de estudios de expresión diferencial de miARN, que se puedan relacionar con el nuevo tipo de muerte celular observada en las neuronas (Chen, Hambright, Na y Ran, 2015), conocida como ferroptosis. Sobre todo porque se ha observado en fibroblastos humanos, con silenciamiento del gen FXN, que mediante el empleo de inhibidores de ferroptosis como el SRS11-92, se producía una disminución de la muerte celular (Grazia Cotticelli *et al.*, 2019). Esta búsqueda de miARN y su posible relación con rutas moleculares en la FRDA, podría ayudar a la identificación de nuevos biomarcadores para esta enfermedad.

Con estos precedentes, nuestro grupo de investigación decidió estudiar posibles perfiles de miARN que podrían estar alterados en modelos celulares de SH-SY5Y. La línea celular SH-SY5Y, es un excelente modelo para la ataxia de Friedreich, debido a que

tiene el mismo origen de desarrollo en la cresta neural de las células de neuroblastoma y los ganglios de la raíz dorsal afectados en pacientes con FRDA. Dentro de estos modelos celulares, se utilizaron la línea control SH-SY5Y, la línea pLKO que contenían el vector de transfección sin el ARN de interferencia, y las líneas pLKO.1-FXN-138.1 y pLKO.1-FXN-138.2 que contenían el vector de transfección con el ARN de interferencia para silenciar la proteína frataxina. Estas últimas presentaban una reducción del 82% y 68% de los niveles de proteína, respectivamente.

Previamente a este trabajo, se realizó un análisis de secuenciación de ARN pequeños por el grupo de investigación, que identificó un perfil de expresión diferencial de miARN entre los modelos celulares deficientes en frataxina (pLKO-FXN) y el modelo control (SH y pLKO). Concretamente se identificaron los miR-15a-3p, miR-106b-5p, miR-106b-3p, miR-10b-5p y miR-409-3p, mediante un análisis de expresión diferencial. Para identificar la importancia de estos miARN, y siguiendo los objetivos planteados en este trabajo, se realizó un análisis de validación por RT-qPCR en los modelos celulares deficientes en frataxina respecto a los grupos controles. Los resultados obtenidos en este análisis mostraron que los niveles de expresión del miR-15a-3p, miR-106b-5p y miR-106b-3p presentaban niveles de expresión reducidos en los modelos celulares deficientes en frataxina (pLKO-FXN) respecto al grupo control (**Figura 7a, 7b y 7c, respectivamente**). Por otro lado, el miR-10b-5p presentaba una mayor expresión en el grupo pLKO-FXN respecto al grupo control (**Figura 7d**). El miR-409-3p por su parte, no mostraba diferencias significativas a pesar de haberse obtenido en el análisis de secuenciación previo, lo que destaca la importancia de la validación por RT-qPCR (**Figura 7e**). Estos resultados evidencian que la reducción en los niveles de expresión de la frataxina produce una alteración en los perfiles de los miARN de los modelos celulares pLKO-FXN.

La obtención de este perfil de expresión diferencial de miARN es importante, porque se ha observado evidencias en la literatura científica de la desregulación de estos miARN en diversas enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, el miR-10b-5p se ha encontrado sobreexpresado en muestras de corteza prefrontal de personas con la enfermedad de Huntington (Hoss *et al.*, 2015) y la enfermedad de Parkinson (Hoss, Labadorf, Beach, Latourelle y Myers, 2016), como también se ha observado en nuestros modelos celulares deficientes en frataxina (pLKO-FXN). También se han observado niveles reducidos del miR-106b-5p, en muestras de la corteza temporal anterior de personas con la enfermedad de Alzheimer (Hébert *et al.*, 2008) y en diferentes células B de pacientes con esclerosis múltiple (Sievers *et al.*, 2012), lo que coincide con los resultados obtenidos en el análisis de validación por RT-qPCR. Sin embargo, se ha

observado niveles aumentados del miR-106b-5p en las células T de los pacientes con esclerosis múltiple (Ma *et al.*, 2014). Este hecho sugiere que el miR-106b-5p puede tener una expresión específica según cada tipo de tejido y puede desempeñar diferentes funciones en cada tejido. El miR-106b-3p, se ha encontrado subexpresado en muestras de sangre periférica de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica esporádica (Liguori *et al.*, 2018), al igual que lo observado en nuestros modelos pLKO-FXN. Por último, el miR-15a-3p que hemos encontrado alterado en los modelos de FRDA, se ha observado desregulado en plasma sanguíneo de un modelo experimental de encefalomiелitis autoinmune de esclerosis múltiple (Martinez y Peplow, 2020). Al respecto, parece interesante una mayor investigación acerca de la función de estos miARN y su implicación en las enfermedades neurodegenerativas, como se ha observado en la FRDA.

En el análisis de las posibles dianas y de las posibles rutas con valor biológico afectadas, de los miARN validados. Se observa que el miR-106b-3p es un modulador de la expresión de la enzima PTEN, el miR-10b-5p regula al factor de transcripción FOXO3A, el miR-106b-5p regula a la expresión de la proteína ACSL4 y el miR-15a-3p regula a la proteína GPX4 (**Figura 8**). La enzima PTEN como el factor de transcripción FOXO3A, intervienen en la ruta FoxO, la cual termina con la regulación de la proteína atrogina-1 codificada por el gen *FBXO32* (Sandri *et al.*, 2004). Por otro lado, la identificación de las proteínas ACSL4 y GPX4, se correlaciona de forma directa con el proceso de ferroptosis, la cual podría estar implicada en la muerte de las neuronas de los pacientes con FRDA (Seiler *et al.*, 2008; Doll *et al.*, 2017). Observándose estos resultados, se decidió analizar los niveles de expresión génica y proteica de dichas dianas, para evidenciar si finalmente desarrollaban un papel relevante en el transcurso de la enfermedad.

La atrofia muscular se ha descrito como una de las manifestaciones principales de la FRDA, esta podría ser consecuencia de la degeneración progresiva de los ganglios de la raíz dorsal identificada en los pacientes con FRDA (Bidichandani y Delatycki, 1998). En el análisis de las dianas de los miARN validados, se observó una mayor expresión del miR-10b-5p el cual tiene como diana el factor de transcripción FOXO3a (**Figura 8**), y el cual a su vez regula la expresión de la proteína atrogina-1 (Sandri *et al.*, 2004). En los resultados obtenidos en el análisis de expresión génica por RT-qPCR se observa un aumento significativo de la expresión de atrogina-1 a nivel génico, que se confirmó mediante el análisis por Western-Blot de los niveles proteicos (**Figuras 9 y 10, respectivamente**). Estos resultados confirman la implicación de esta proteína en la FRDA. La proteína atrogina-1, codificada por el gen *FBXO32*, es una ubiquitina ligasa que se expresa fundamentalmente en tejido muscular, aunque se ha observado su

expresión en otros tejidos como el cerebro. Ésta interviene en procesos importantes a nivel cerebral como la transición epitelio-mesenquimal (Sahu *et al.*, 2017) o en la regulación de la Endofilina-A encargada de mantener la salud neuronal (Murdoch *et al.*, 2016). Además, hemos observado que el miR-106b-3p, presentaba unos niveles de expresión reducidos en los modelos deficiente en frataxina, que tiene como diana la proteína PTEN. Ésta interviene en la regulación de la ruta AKT, por lo que podría estar inhibiendo la acción última de esta al no permitir la fosforilación del factor de transcripción FOXO3a, favoreciendo la translocación de este al núcleo (Nho y Hergert, 2014) y aumentando la expresión de la proteína atrogina-1.

Por otro lado, atrogina-1 se ha identificado como un importante regulador de la atrofia muscular, observándose niveles elevados de su expresión durante dicho proceso (Gomes, Lecker, Jagoe, Navon y Goldberg, 2001). En diversos estudios, se ha identificado la vía de señalización de la calcineurina y factor nuclear de la vía de señalización dependiente de células T activadas (NFAT), como un importante regulador en los procesos de atrofia muscular (Hudson, Woodworth-Hobbs, Gooch y Russ Price, 2012). La calcineurina A, es una serina/treonina fosfatasa activada por calcio que desfosforila y activa a los miembros de la familia NFAT (Nguyen y Di Giovanni, 2008). A su vez, la expresión de atrogina-1 disminuye los niveles de calcineurina A y promueve su ubiquitinación. Además, la atrogina-1 atenúa la actividad de la calcineurina y reprime la transactivación dependiente de la calcineurina y la translocación de NFATc4 (Li *et al.*, 2004). De hecho, estudios con ratones mutantes triples NFATc2/c3/c4 demuestran que la extensión y la organización de la proyección sensorial del axón y el crecimiento del axón comisural dependen de la actividad de NFAT (Graef *et al.*, 2003). Lo que sustenta el papel fundamental de atrogina-1 en el correcto desarrollo y salud neuronal, junto con la regulación de la atrofia muscular.

La ferroptosis, como se ha mencionado anteriormente, se trata de un nuevo tipo de muerte celular que se ha relacionado con la acumulación de hierro y peroxidación de lípidos, lo que hace que este proceso de muerte celular sea genética y bioquímicamente distinto al de la apoptosis o las vías necróticas (Li *et al.*, 2020). El aumento de los niveles de lípidos peroxidados y los ERO en neuronas de pacientes con FRDA, sugiere que la FRDA podría estar estrechamente relacionada con la ferroptosis (Codazzi *et al.*, 2016).

Para evaluar los niveles de expresión de los genes diana de los miARN implicadas en las rutas de ferroptosis de la FRDA, se realizó un análisis por RT-qPCR. En los resultados, se observó un aumento significativo de la expresión de la proteína GPX4 en los modelos deficientes en frataxina (**Figura 12a y 12c**). Este aumento podría estar

favorecido por la disminución de los niveles de expresión observados en el miR-15a-3p. La proteína GPX4 se ha relacionado de forma directa con el proceso de ferroptosis, debido a que esta podría actuar como principal regulador en dicho proceso (Seibt, Proneth y Conrad, 2019). Su función consiste en la reducción de los hidroperóxidos complejos, incluidos los hidroperóxidos fosfolipídicos y los hidroperóxidos de colesterol a sus formas correspondientes, interrumpiendo así la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. De hecho, se ha observado en un estudio que la delección de *Gpx4* en cerebro y fibroblastos de ratones, provocaba la neurodegeneración y muerte celular de las neuronas del hipocampo de forma no apoptótica, sino mediante la acumulación masiva de lípidos peroxidados (Seiler *et al.*, 2008). Además, en otro estudio posterior realizado en células de ratón, se observó que la eliminación de *Gpx4* provoca la muerte celular, la cual puede ser suprimida por antioxidantes lipofílicos (por ejemplo, Fer-1) y quelantes de hierro, lo que confirma aún más que la actividad GPX4 es esencial para prevenir la ferroptosis (Friedmann Angeli *et al.*, 2014). Estos estudios junto con los resultados obtenidos en este trabajo, nos conduce a pensar que podría tratarse de algún tipo de mecanismo compensatorio, para la reducción de los niveles de lípidos peroxidados responsables de la muerte celular en el proceso de ferroptosis. Por lo que sería interesante realizar en un futuro, un análisis de lípidos peroxidados y viabilidad celular para confirmar esta hipótesis.

Como se ha mencionado anteriormente, en el análisis de validación de los miARN se identificó el miR-106b-5p, el cual presentaba niveles de expresión reducidos en los modelos pLKO-FXN, implicado en la regulación de la expresión de la proteína ACSL4. La proteína ACSL4, es una acil-CoA sintetasa de ácidos grasos de cadena larga, que activa los ácidos grasos tanto en la síntesis de lípidos celulares como en la degradación de la  $\beta$ -oxidación (Grevengoed, Klett y Coleman, 2014). Sin embargo, aunque el nivel de expresión génica de *ACLS4* fuera mayor, no correlacionó con el nivel de expresión proteica, donde no se observaron diferencias significativas respecto al grupo control y tampoco entre los grupos (**Figuras 12b y 12d**). Esto podría significar que, a pesar de observarse una expresión aumentada a nivel génica, quizás esté involucrado algún otro tipo de regulación. Estudios realizados en células haploides y fibroblastos, han identificado a la proteína ACSL4 como un factor adicional en el proceso de ferroptosis (Dixon *et al.*, 2015; Doll *et al.*, 2017). A pesar de esto, se desconoce todavía su papel exacto en el proceso de ferroptosis, y sería necesaria una mayor investigación en el campo de las enfermedades neurodegenerativas para elucidar esta cuestión.

Otro parámetro importante a tener en cuenta, en el desarrollo de la FRDA, es el estrés oxidativo. Estudios iniciales demostraron que la FRDA está asociada con el estrés oxidativo y la acumulación de ERO (Wong *et al.*, 1999). Posteriormente, también se observó la presencia de estrés oxidativo en modelos de ratones de la enfermedad (Al-Mahdawi *et al.*, 2006). Posiblemente se debe a que la frataxina se localiza en la matriz mitocondrial, hay evidencias que sugieren que la deficiencia de esta proteína provoca la acumulación mitocondrial de hierro, la disminución de la función de la cadena respiratoria y un incremento en la sensibilidad al estrés oxidativo (Babcock *et al.*, 1997). En el análisis de las rutas reguladas por los miARN, se obtuvo que el proceso de respuesta al estrés oxidativo estaba involucrado. Además, los niveles de expresión relativa de la enzima GPX4, mostraron un aumento de expresión proteica. Sin embargo, no sabemos si esta enzima puede realizar correctamente su función, debido a que para detoxificar lípidos peroxidados necesita al GSH como principal cofactor (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013).

El GSH es el principal agente antioxidante celular, cuyo papel se ha propuesto recientemente en la patogénesis de algunas enfermedades neurodegenerativas (Liu, Zhou, Ziegler, Dimitrion y Zuo, 2017). Por ello, se decidió investigar la ruta de biosíntesis del GSH. En ella, intervienen dos enzimas fundamentales la Glutamato-Cisteína Ligasa (GCL), constituida por dos subunidades la catalítica (GCLC) y la modificadora (GCLM), y la Glutación Sintasa (GSS) (Franklin *et al.*, 2009). Para observar el estado de estas subunidades, se analizaron los niveles de expresión relativa de los genes codificantes para dichas enzimas. En los resultados obtenidos, no se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión respecto al grupo control para ninguna de ellas (**Figuras 13a, 13b y 13c**). Además, los niveles de GSH totales, medidos con el kit "The DetectX Glutathione kit", tampoco presentan diferencias significativas en las líneas celulares deficientes en frataxina (pLKO-FXN) respecto al grupo control (**Figura 14b**). Esto podría significar que el estrés oxidativo característico de la FRDA podría deberse a una desregulación de los niveles de GSH total de forma que, en lugar de compensar el incremento del estrés oxidativo, sus niveles se mantienen normales. De esta forma no realiza de manera adecuada su función antioxidante. Además, se ha descrito en la literatura científica un estudio realizado con muestras sanguíneas de pacientes con FRDA, en el cual no se observan diferencias significativas de los niveles de GSH total en los pacientes respecto al grupo control, lo que sustentaría esta hipótesis (Piemonte *et al.*, 2001).

Para el estudio de la presencia de estrés oxidativo, se determinó el ratio GSSG/GSH. Los resultados mostraron un aumento significativo del glutatión oxidado respecto al glutatión reducido (**Figura 14a**). Esto se traduce en un aumento de GSSG respecto al GSH, que no se ve compensado por una mayor producción del mismo por parte de las enzimas encargadas de su biosíntesis. Lo que confirma la presencia de estrés oxidativo en los modelos celulares deficientes en frataxina (pLKO-FXN). Estos resultados junto con el incremento observado en los niveles de expresión de la enzima GPX4, indicaría que existe un estrés oxidativo y que la GPX4 es sobreexpresada para intentar detoxificar los lípidos oxidados. Dado que se ha demostrado, que la sobreexpresión de Gpx4 es protectora contra el daño oxidativo en varias líneas celulares en ratones modelo de la enfermedad (Ran *et al.*, 2004)

Como se ha destacado en este trabajo de investigación, los miARN son biomoléculas que podrían emplearse como biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y monitorización del tratamiento de la FRDA. En concreto, su uso permitiría detectar y consolidar terapias y mejorar la calidad de vida de los pacientes con FRDA. Además, permitiría reducir los costes en ensayos clínicos, mediante el diseño de tratamientos más personalizados y la identificación de las diferentes vías moleculares implicadas en la progresión de la enfermedad. En resumen, este trabajo muestra la relevancia de los miARN en la regulación de rutas implicadas en la fisiopatología de la enfermedad. Así como proporcionar, a partir de un mejor entendimiento de las bases moleculares y fisiológicas que subyacen a la FRDA, diversos candidatos para una posible futura terapia, posibles biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y monitorización de ensayos clínicos de estos pacientes.



## **6. Conclusiones**

---

1. La reducción de los niveles de frataxina en el modelo celular neuronal pLKO-FXN tiene asociada la firma de los miR-15a-3p, miR-106b-5p, miR-106b-3p y miR-10b-5p.
2. Las rutas reguladas por estos miARN son las rutas de FoxO, metabolismo de ácidos grasos y estrés oxidativo, que contenían dianas de estos miARN de forma significativa.
3. La expresión de la proteína atrogina-1 está aumentada en las líneas pLKO-FXN respecto a los controles. Lo que podría estar indicando una activación de la muerte neuronal en el modelo celular de deficiencia en frataxina.
4. La expresión del miR-15a-3p se encuentra disminuida en las líneas pLKO-FXN, produciendo un aumento en la expresión de la enzima GPX4, y por tanto podría ser un posible biomarcador de ferroptosis en FRDA.
5. Los niveles de glutatión oxidado están aumentados en las líneas pLKO-FXN. Confirmando la existencia de estrés oxidativo y la posible presencia de ferroptosis en estos modelos celulares.



## **7. Limitaciones**

---

La principal limitación a la hora de la realización del presente trabajo ha sido el trabajar con una enfermedad rara, puesto que debido a su naturaleza poco frecuente y al bajo número de muestras que se puede encontrar, no es fácil trabajar con muestras de pacientes. Por ello, en este trabajo se ha tenido que generar unos modelos celulares para realizar la investigación. Además, la tecnología utilizada mediante transfección con vectores es compleja y hace que el número de muestras sea bajo, lo que dificulta el análisis estadístico.

Otra limitación muy importante en este estudio ha sido la actual pandemia del SARS-CoV-2 en la que nos encontramos. Debido a esta pandemia, nos hemos visto forzados a detener las prácticas, y por tanto a la realización de experimentos accesorios a la investigación que habrían complementado este trabajo.



## 8. Líneas futuras

---

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran la relevancia de los miARN en la patogénesis de la FRDA y la desregulación de algunas proteínas implicadas en el nuevo tipo de muerte celular conocido como ferroptosis.

Por una parte, sería importante estudiar tanto a nivel de expresión génica como a nivel de expresión de proteína *FOXO3A*. Como hemos mencionado anteriormente, esta proteína está implicada en la regulación de la expresión de la proteína atrogina-1 asociada con la atrofia muscular. Por lo que sería interesante, observar si dichos niveles se encuentran alterados y activados mediante el ratio de *FOXO3A* fosforilada respecto a *FOXO3A* sin fosforilar.

Por otra parte, dado que el proceso final de la ferroptosis consiste en la peroxidación de lípidos los cuales se acumulan produciendo el efecto tóxico que conlleva la muerte celular. Sería interesante estudiar, tanto en este modelo celular como en otros modelos descritos en la literatura como linfoblastos, los niveles de lípidos peroxidados. Esto podría llevarse a cabo mediante un ensayo por citometría de flujo, evaluando la oxidación de los lípidos a nivel basal y mediante el empleo de un agente inductor, como podría ser el *Cumene*. Estos resultados, permitirían observar si hay diferencias significativas en los niveles de lípidos oxidados respecto a los controles o si las líneas pLKO-FXN tienen una mayor susceptibilidad a la oxidación lipídica respecto a los controles (Nakashima, Ohta y Wolf, 2017).



## 10. Bibliografía

---

- Abrahão, A., Pedroso, J., Braga-Neto, P., Bor-Seng-Shu, E., de Carvalho Aguiar, P., & Barsottini, O. (2015). Milestones in Friedreich ataxia: more than a century and still learning. *Neurogenetics*, 16(3), 151-160. doi: 10.1007/s10048-015-0439-z
- Adamec, J., Rusnak, F., Owen, W., Naylor, S., Benson, L., Gacy, A., & Isaya, G. (2000). Iron-Dependent Self-Assembly of Recombinant Yeast Frataxin: Implications for Friedreich Ataxia. *The American Journal Of Human Genetics*, 67(3), 549-562. doi: 10.1086/303056
- Alexander, M. S., & Kunkel, L. M. (2015). Skeletal Muscle MicroRNAs: Their Diagnostic and Therapeutic Potential in Human Muscle Diseases. *Journal of neuromuscular diseases*, 2(1), 1–11. <https://doi.org/10.3233/JND-140058>
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R. M., Varshney, D., Lawrence, L., Lowrie, M. B., Hughes, S., Webster, Z., Blake, J., Cooper, J. M., King, R., & Pook, M. A. (2006). GAA repeat expansion mutation mouse models of Friedreich ataxia exhibit oxidative stress leading to progressive neuronal and cardiac pathology. *Genomics*, 88(5), 580–590. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.06.015>
- Armstrong, J., Khmour, O., & Hecht, S. (2010). Does oxidative stress contribute to the pathology of Friedreich's ataxia? A radical question. *The FASEB Journal*, 24(7), 2152-2163. doi: 10.1096/fj.09-143222
- Auchere, F., Santos, R., Planamente, S., Lesuisse, E., & Camadro, J. (2008). Glutathione-dependent redox status of frataxin-deficient cells in a yeast model of Friedreich's ataxia. *Human Molecular Genetics*, 17(18), 2790-2802. doi: 10.1093/hmg/ddn178

- Babcock, M., De Silva, D., Oaks, R., Davis-Kaplan, S., Jiralerspong, S., & Montermini, L. *et al.* (1997). Regulation of Mitochondrial Iron Accumulation by Yfh1p, a Putative Homolog of Frataxin. *Science*, 276(5319), 1709-1712. doi: 10.1126/science.276.5319.1709
- Bencze, K., Kondapalli, K., Cook, J., McMahon, S., Millán-Pacheco, C., Pastor, N., & Stemmler, T. (2006). The Structure and Function of Frataxin. *Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology*, 41(5), 269-291. doi: 10.1080/10409230600846058
- Bidichandani, S.I., Delatycki, M.B. (1998) Friedreich Ataxia. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1281/>
- Biedler, J., Helson, L., & Spengler, B. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Research*, 33(11), 2643-52. Recuperado de: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/33/11/2643.long>
- Biedler, J., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., & Freedman, L. (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Research*, 38(11 Pt 1), 3751-7. Recuperado de: [https://cancerres.aacrjournals.org/content/38/11\\_Part\\_1/3751.long](https://cancerres.aacrjournals.org/content/38/11_Part_1/3751.long)
- Bolinches-Amorós, A., Mollá, B., Pla-Martín, D., Palau, F., & González-Cabo, P. (2014). Mitochondrial dysfunction induced by frataxin deficiency is associated with cellular senescence and abnormal calcium metabolism. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00124>
- Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3289-3303. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020

- Calabrese, V., Lodi, R., Tonon, C., D'Agata, V., Sapienza, M., & Scapagnini, G. *et al.* (2005). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *Journal Of The Neurological Sciences*, 233(1-2), 145-162. doi: 10.1016/j.jns.2005.03.012
- Campuzano, V., Montermini, L., Lutz, Y., Cova, L., Hindelang, C., & Jiralerspong, S. *et al.* (1997). Frataxin is Reduced in Friedreich Ataxia Patients and is Associated with Mitochondrial Membranes. *Human Molecular Genetics*, 6(11), 1771-1780. doi: 10.1093/hmg/6.11.1771
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M., Pianese, L., Cossee, M., & Cavalcanti, F. *et al.* (1996). Friedreich's Ataxia: Autosomal Recessive Disease Caused by an Intronic GAA Triplet Repeat Expansion. *Science*, 271(5254), 1423-1427. doi: 10.1126/science.271.5254.1423
- Cao, J. Y., Poddar, A., Magtanong, L., Lumb, J. H., Mileur, T. R., Reid, M. A., Dovey, C. M., Wang, J., Locasale, J. W., Stone, E., Cole, S. P. C., Carette, J. E., & Dixon, S. J. (2019). A Genome-wide Haploid Genetic Screen Identifies Regulators of Glutathione Abundance and Ferroptosis Sensitivity. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.043>
- Chamberlain, S., Shaw, J., Rowland, A., Wallis, J., South, S., Nakamura, Y., von Gabain, A., Farrall, M., y Williamson, R. (1988) Mapping of mutation causing Friedreich's ataxia to human chromosome 9. *Nature*, 334(6179), 248-250. doi:10.1038/334248a0
- Chantrel-Groussard, K., Geromel, V., Puccio, H., Koenig, M., Munnich, A., Rötig, A., & Rustin, P. (2001). Disabled early recruitment of antioxidant defenses in Friedreich's ataxia. *Human Molecular Genetics*, 10(19), 2061-2067. doi: 10.1093/hmg/10.19.2061

- Chen, L., Hambright, W. S., Na, R., & Ran, Q. (2015). Ablation of the Ferroptosis Inhibitor Glutathione Peroxidase 4 in Neurons Results in Rapid Motor Neuron Degeneration and Paralysis. *The Journal of biological chemistry*, 290(47), 28097–28106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680090>
- Cheng, Z., & Li, Y. (2007). What is responsible for the initiating chemistry of iron-mediated lipid peroxidation: An update. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/cr040077w>
- Chiang, S., Kovacevic, Z., Sahni, S., Lane, D., Merlot, A., & Kalinowski, D. *et al.* (2016). Frataxin and the molecular mechanism of mitochondrial iron-loading in Friedreich's ataxia. *Clinical Science*, 130(11), 853-870. doi: 10.1042/cs20160072
- Clark, R., Dalgliesh, G., Endres, D., Gomez, M., Taylor, J., & Bidichandani, S. (2004). Expansion of GAA triplet repeats in the human genome: unique origin of the FRDA mutation at the center of an Alu. *Genomics*, 83(3), 373-383. doi: 10.1016/j.ygeno.2003.09.001
- Cnop, M., Mulder, H., & Igoillo-Esteve, M. (2013). Diabetes in Friedreich Ataxia. *Journal Of Neurochemistry*, 126, 94-102. doi: 10.1111/jnc.12216
- Codazzi, F., Hu, A., Rai, M., Donatello, S., Salerno Scarzella, F., & Mangiameli, E. *et al.* (2016). Friedreich ataxia-induced pluripotent stem cell-derived neurons show a cellular phenotype that is corrected by a benzamide HDAC inhibitor. *Human Molecular Genetics*, ddw308. doi: 10.1093/hmg/ddw308
- Cogswell, J., Ward, J., Taylor, I., Waters, M., Shi, Y., & Cannon, B. *et al.* (2008). Identification of miRNA Changes in Alzheimer's Disease Brain and CSF Yields Putative Biomarkers and Insights into Disease Pathways. *Journal Of Alzheimer's Disease*, 14(1), 27-41. doi: 10.3233/jad-2008-14103
- Colin, F., Martelli, A., Clémancey, M., Latour, J., Gambarelli, S., & Zeppieri, L. *et al.* (2013). Mammalian Frataxin Controls Sulfur Production and Iron Entry during de Novo

Fe4S4 Cluster Assembly. *Journal Of The American Chemical Society*, 135(2), 733-740. doi: 10.1021/ja308736e

Condò, I., Malisan, F., Guccini, I., Serio, D., Rufini, A., & Testi, R. (2010). Molecular control of the cytosolic aconitase/IRP1 switch by extramitochondrial frataxin. *Human Molecular Genetics*, 19(7), 1221-1229. doi: 10.1093/hmg/ddp592

Cossée, M., Dürr, A., Schmitt, M., Dahl, N., Trouillas, P., & Allinson, P. *et al.* (1999). Friedreich's ataxia: Point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Annals Of Neurology*, 45(2), 200-206. doi: 10.1002/1531-8249(199902)45:2<200::aid-ana10>3.0.co;2-u

Dantham, S., Srivastava, A., Gulati, S., & Rajeswari, M. (2017). Differentially Regulated Cell-Free MicroRNAs in the Plasma of Friedreich's Ataxia Patients and Their Association with Disease Pathology. *Neuropediatrics*, 49(01), 035-043. doi: 10.1055/s-0037-1607279

De Biase, I., Chutake, Y., Rindler, P., & Bidichandani, S. (2009). Epigenetic Silencing in Friedreich Ataxia Is Associated with Depletion of CTCF (CCCTC-Binding Factor) and Antisense Transcription. *Plos ONE*, 4(11), e7914. doi: 10.1371/journal.pone.0007914

Dhe-Paganon, S., Shigeta, R., Chi, Y., Ristow, M., & Shoelson, S. (2000). Crystal Structure of Human Frataxin. *Journal Of Biological Chemistry*, 275(40), 30753-30756. doi: 10.1074/jbc.c000407200

Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>

- Dixon, S. J., Winter, G. E., Musavi, L. S., Lee, E. D., Snijder, B., Rebsamen, M., Superti-Furga, G., & Stockwell, B. R. (2015). Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes in Nonapoptotic Cell Death. *ACS Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00245>
- Doll, S., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Panzilius, E., Kobayashi, S., Ingold, I., Irmeler, M., Beckers, J., Aichler, M., Walch, A., Prokisch, H., Trümbach, D., Mao, G., Qu, F., Bayir, H., Füllekrug, J., Scheel, C. H., Wurst, W., Schick, J. A., ... Conrad, M. (2017). ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nature Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2239>
- Dürr, A., Cossee, M., Agid, Y., Campuzano, V., Mignard, C., & Penet, C. *et al.* (1996). Clinical and Genetic Abnormalities in Patients with Friedreich's Ataxia. *New England Journal Of Medicine*, 335(16), 1169-1175. doi: 10.1056/nejm199610173351601
- Eckert, D., Buhl, S., Weber, S., Jäger, R., & Schorle, H. (2005). The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biology*, 6(13), 246. doi: 10.1186/gb-2005-6-13-246
- Edenharter, O., Schneuwly, S., & Navarro, J. A. (2018). Mitofusin-dependent ER stress triggers glial dysfunction and nervous system degeneration in a drosophila model of friedreich's ataxia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00038>
- Filla, A., De Michele, G., Cavalcanti, F., Pianese, L., Monticelli, A., Campanella, G., & Coccozza, S. (1996). The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *American journal of human genetics*, 59(3), 554–560.
- Foury, F., & Cazzalini, O. (1997). Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Letters*, 411(2-3), 373-377. doi: 10.1016/s0014-5793(97)00734-5

- Foury, F., Pastore, A., & Trincal, M. (2006). Acidic residues of yeast frataxin have an essential role in Fe–S cluster assembly. *EMBO Reports*, 8(2), 194-199. doi: 10.1038/sj.embor.7400881
- Franklin, C. C., Backos, D. S., Mohar, I., White, C. C., Forman, H. J., & Kavanagh, T. J. (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.009>
- Friedmann Angeli, J. P., Schneider, M., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Hammond, V. J., Herbach, N., Aichler, M., Walch, A., Eggenhofer, E., Basavarajappa, D., Rådmark, O., Kobayashi, S., Seibt, T., Beck, H., Neff, F., Esposito, I., Wanke, R., Förster, H., ... Conrad, M. (2014). Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb3064>
- Gao, M., Monian, P., Pan, Q., Zhang, W., Xiang, J., & Jiang, X. (2016). Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Research*. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.95>
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>
- Gomes, M. D., Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Navon, A., & Goldberg, A. L. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25), 14440–14445. <https://doi.org/10.1073/pnas.251541198>
- Graef, I., Wang, F., Charron, F., Chen, L., Neilson, J., Tessier-Lavigne, M., & Crabtree, G. (2003). Neurotrophins and Netrins Require Calcineurin/NFAT Signaling to Stimulate Outgrowth of Embryonic Axons. *Cell*, 113(5), 657-670. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00390-8

- Grazia Cotticelli, M., Xia, S., Lin, D., Lee, T., Terrab, L., Wipf, P., Huryn, D. M., & Wilson, R. B. (2019). Ferroptosis as a novel therapeutic target for Friedreich's ataxia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. <https://doi.org/10.1124/jpet.118.252759>
- Grevengoed, T. J., Klett, E. L., & Coleman, R. A. (2014). Acyl-CoA metabolism and partitioning. *Annual review of nutrition*, 34, 1–30. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071813-105541>
- Guo, R., Fan, G., Zhang, J., Wu, C., Du, Y., & Ye, H. *et al.* (2017). A 9-microRNA Signature in Serum Serves as a Noninvasive Biomarker in Early Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Journal Of Alzheimer's Disease*, 60(4), 1365-1377. doi: 10.3233/jad-170343
- Hébert, S. S., Horré, K., Nicolaï, L., Papadopoulou, A. S., Mandemakers, W., Silahtaroglu, A. N., Kauppinen, S., Delacourte, A., & De Strooper, B. (2008). Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(17), 6415–6420. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710263105>
- Hoss, A. G., Labadorf, A., Beach, T. G., Latourelle, J. C., & Myers, R. H. (2016). microRNA Profiles in Parkinson's Disease Prefrontal Cortex. *Frontiers in aging neuroscience*, 8, 36. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00036>
- Hoss, A. G., Labadorf, A., Latourelle, J. C., Kartha, V. K., Hadzi, T. C., Gusella, J. F., MacDonald, M. E., Chen, J. F., Akbarian, S., Weng, Z., Vonsattel, J. P., & Myers, R. H. (2015). miR-10b-5p expression in Huntington's disease brain relates to age of onset and the extent of striatal involvement. *BMC medical genomics*, 8, 10. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0083-3>

Hudson, M., Woodworth-Hobbs, M., Gooch, J., & Russ Price, S. (2012). Calcineurin-NFAT signaling regulates atrogen-1 and MuRF1 via microRNA-23a (miR-23a) during muscle atrophy. *Kidney Research And Clinical Practice*, 31(2), A92. doi: 10.1016/j.krcp.2012.04.625

Inserm (2020). Orphanet: About rare diseases. [Página Web] Recuperado de: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education\\_AboutRareDiseases.php?Ing=EN](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education_AboutRareDiseases.php?Ing=EN)

Jiralerspong, S., Ge, B., Hudson, T., & Pandolfo, M. (2001). Manganese superoxide dismutase induction by iron is impaired in Friedreich ataxia cells. *FEBS Letters*, 509(1), 101-105. doi: 10.1016/s0014-5793(01)03140-4

Johnson, R., Zuccato, C., Belyaev, N., Guest, D., Cattaneo, E., & Buckley, N. (2008). A microRNA-based gene dysregulation pathway in Huntington's disease. *Neurobiology Of Disease*, 29(3), 438-445. doi: 10.1016/j.nbd.2007.11.001

Kagan, V. E., Mao, G., Qu, F., Angeli, J. P. F., Doll, S., Croix, C. S., Dar, H. H., Liu, B., Tyurin, V. A., Ritov, V. B., Kapralov, A. A., Amoscato, A. A., Jiang, J., Anthonymuthu, T., Mohammadyani, D., Yang, Q., Proneth, B., Klein-Seetharaman, J., Watkins, S., ... Baylr, H. (2017). Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nature Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2238>

Keage, M., Delatycki, M., Gupta, I., Corben, L., & Vogel, A. (2017). Dysphagia in Friedreich Ataxia. *Dysphagia*, 32(5), 626-635. doi: 10.1007/s00455-017-9804-4

Knöll, B., & Nordheim, A. (2009). Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm. *Trends In Neurosciences*, 32(8), 432-442. doi: 10.1016/j.tins.2009.05.004

Kruskal-Wallis Test. (2008). *The Concise Encyclopedia Of Statistics*, 288-290. doi: 10.1007/978-0-387-32833-1\_216

Laboratorio Griffiths-Jones de la Facultad de Biología, Medicina y Salud de la Universidad

- de Manchester. (2020). miRBase: the microRNA database [Página Web]  
Recuperado de: <http://www.mirbase.org/>
- Lamarche, J., Côté, M., & Lemieux, B. (1980). The Cardiomyopathy of Friedreich's Ataxia  
Morphological Observations in 3 Cases. *Canadian Journal Of Neurological Sciences*  
/ *Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 7(4), 389-396. doi:  
10.1017/s0317167100022927
- Lewerenz, J., Ates, G., Methner, A., Conrad, M., & Maher, P. (2018). Oxytosis/Ferroptosis—  
(Re-) Emerging Roles for Oxidative Stress-Dependent Non-apoptotic Cell Death in  
Diseases of the Central Nervous System. *Frontiers In Neuroscience*, 12, 214. doi:  
10.3389/fnins.2018.00214
- Li, H. H., Kedar, V., Zhang, C., McDonough, H., Arya, R., Wang, D. Z., & Patterson, C.  
(2004). Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac  
hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *The Journal of*  
*clinical investigation*, 114(8), 1058–1071. <https://doi.org/10.1172/JCI22220>
- Li, J., Cao, F., Yin, H., Huang, Z., Lin, Z., & Mao, N. *et al.* (2020). Ferroptosis: past, present  
and future. *Cell Death & Disease*, 11(2). doi: 10.1038/s41419-020-2298-2
- Liguori, M., Nuzziello, N., Introna, A., Consiglio, A., Licciulli, F., & D'Errico, E. *et al.* (2018).  
Dysregulation of MicroRNAs and Target Genes Networks in Peripheral Blood of  
Patients With Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers In Molecular*  
*Neuroscience*, 11. doi: 10.3389/fnmol.2018.00288
- Linseman, K., Larson, P., Braugher, J., & McCall, J. (1993). Iron-initiated tissue oxidation:  
Lipid peroxidation, vitamin e destruction and protein thiol oxidation. *Biochemical*  
*Pharmacology*, 45(7), 1477-1482. doi: 10.1016/0006-2952(93)90048-2
- Liu, Z., Zhou, T., Ziegler, A. C., Dimitrion, P., & Zuo, L. (2017). Oxidative Stress in  
Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications.

*Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 2525967.  
<https://doi.org/10.1155/2017/2525967>

Livak, K., & Schmittgen, T. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

López-Arlandis, J.M., Vílchez, J.J., Palau, F., y Sevilla, T. (1995) Friedreich's ataxia: an epidemiological study in Valencia, Spain, based on consanguinity analysis. *Neuroepidemiology*, 14 (1), 14-9. doi:10.1159/000109774

Ma, X., Zhou, J., Zhong, Y., Jiang, L., Mu, P., Li, Y., Singh, N., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. (2014). Expression, regulation and function of microRNAs in multiple sclerosis. *International journal of medical sciences*, 11(8), 810–818.  
<https://doi.org/10.7150/ijms.8647>

Mancias, J. D., Wang, X., Gygi, S. P., Harper, J. W., & Kimmelman, A. C. (2014). Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature13148>

Martelli, A., & Puccio, H. (2014). Dysregulation of cellular iron metabolism in Friedreich ataxia: from primary iron-sulfur cluster deficit to mitochondrial iron accumulation. *Frontiers In Pharmacology*, 5, 130. doi: 10.3389/fphar.2014.00130

Martelli, A., Wattenhofer-Donzé, M., Schmucker, S., Bouvet, S., Reutenauer, L., & Puccio, H. (2007). Frataxin is essential for extramitochondrial Fe–S cluster proteins in mammalian tissues. *Human Molecular Genetics*, 16(22), 2651-2658. doi: 10.1093/hmg/ddm163

Martinez, B., & Peplow, P. V. (2020). MicroRNAs as disease progression biomarkers and therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple

sclerosis. *Neural regeneration research*, 15(10), 1831–1837.  
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.280307>

Monrós, E., Moltó, M. D., Martínez, F., Cañizares, J., Blanca, J., Vílchez, J. J., Prieto, F., de Frutos, R., & Palau, F. (1997). Phenotype correlation and intergenerational dynamics of the Friedreich ataxia GAA trinucleotide repeat. *American journal of human genetics*, 61(1), 101–110. <https://doi.org/10.1086/513887>

Montermini, L., Andermann, E., Labuda, M., Richter, A., Pandolfo, M., & Cavalcanti, F. *et al.* (1997). The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles. *Human Molecular Genetics*, 6(8), 1261-1266. doi: 10.1093/hmg/6.8.1261

Murdoch, J., Rostosky, C., Gowrisankaran, S., Arora, A., Soukup, S., & Vidal, R. *et al.* (2016). Endophilin-A Deficiency Induces the Foxo3a-Fbxo32 Network in the Brain and Causes Dysregulation of Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Cell Reports*, 17(4), 1071-1086. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.058

Muthuswamy, S., & Agarwal, S. (2015). Friedreich ataxia from the eye of a molecular biologist. *Neurologist*. <https://doi.org/10.1097/NRL.0000000000000054>

Nakashima, Y., Ohta, S., & Wolf, A. (2017). Blue light-induced oxidative stress in live skin. *Free Radical Biology And Medicine*, 108, 300-310. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.03.010

Napoli, E., Taroni, F., & Cortopassi, G. (2006). Frataxin, Iron–Sulfur Clusters, Heme, ROS, and Aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(3-4), 506-516. doi: 10.1089/ars.2006.8.506

Nguyen, T., & Di Giovanni, S. (2008). NFAT signaling in neural development and axon growth. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 26(2), 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2007.10.004>

- Nho, R. S., & Hergert, P. (2014). FoxO3a and disease progression. *World journal of biological chemistry*, 5(3), 346–354. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v5.i3.346>
- Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Kostoulas, N., Vlachos, I. S., Vergoulis, T., Reczko, M., Filippidis, C., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2013). DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic acids research*, 41(Web Server issue), W169–W173. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt393>
- Paupé, V., Dassa, E., Goncalves, S., Auchère, F., Lönn, M., Holmgren, A., & Rustin, P. (2009). Impaired Nuclear Nrf2 Translocation Undermines the Oxidative Stress Response in Friedreich Ataxia. *Plos ONE*, 4(1), e4253. doi: 10.1371/journal.pone.0004253
- Piemonte, F., Pastore, A., Tozzi, G., Tagliacozzi, D., Santorelli, F., & Carrozzo, R. *et al.* (2001). Glutathione in blood of patients with Friedreich's ataxia. *European Journal Of Clinical Investigation*, 31(11), 1007-1011. doi: 10.1046/j.1365-2362.2001.00922.x
- Punga, T., & Bühler, M. (2010). Long intronic GAA repeats causing Friedreich ataxia impede transcription elongation. *EMBO molecular medicine*, 2(4), 120–129. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000064>
- Ran, Q., Liang, H., Gu, M., Qi, W., Walter, C., & Roberts, L. *et al.* (2004). Transgenic Mice Overexpressing Glutathione Peroxidase 4 Are Protected against Oxidative Stress-induced Apoptosis. *Journal Of Biological Chemistry*, 279(53), 55137-55146. doi: 10.1074/jbc.m410387200
- Rötig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., & Sidi, D. *et al.* (1997). Aconitase and mitochondrial iron–sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nature Genetics*, 17(2), 215-217. doi: 10.1038/ng1097-215
- Saccà, F., Puorro, G., Antenora, A., Marsili, A., Denaro, A., Piro, R., Sorrentino, P., Pane,

- C., Tessa, A., Brescia Morra, V., Coccozza, S., De Michele, G., Santorelli, F. M., & Filla, A. (2011). A combined nucleic acid and protein analysis in Friedreich ataxia: implications for diagnosis, pathogenesis and clinical trial design. *Plos ONE*, 6(3), e17627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017627>
- Sahu, S., Tiwari, N., Pataskar, A., Zhuang, Y., Borisova, M., & Diken, M. *et al.* (2017). FBXO32 promotes microenvironment underlying epithelial-mesenchymal transition via CtBP1 during tumour metastasis and brain development. *Nature Communications*, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-01366-x
- Sandi, C., Al-Mahdawi, S., & Pook, M. A. (2013). Epigenetics in Friedreich's Ataxia: Challenges and Opportunities for Therapy. *Genetics research international*, 2013, 852080. <https://doi.org/10.1155/2013/852080>
- Sandi, C., Sandi, M., Anjomani Virmouni, S., Al-Mahdawi, S., & Pook, M. A. (2014). Epigenetic-based therapies for Friedreich ataxia. *Frontiers in genetics*, 5, 165. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00165>
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S. H., & Goldberg, A. L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 117(3), 399–412. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00400-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00400-3)
- Santana-Codina, N., & Mancias, J. D. (2018). The role of NCOA4-mediated ferritinophagy in health and disease. *Pharmaceuticals*. <https://doi.org/10.3390/ph11040114>
- Santos, R., Lefevre, S., Sliwa, D., Seguin, A., Camadro, J., & Lesuisse, E. (2010). Friedreich Ataxia: Molecular Mechanisms, Redox Considerations, and Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(5), 651-690. doi: 10.1089/ars.2009.3015

- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schulz, J., & Pandolfo, M. (2013). 150 years of Friedreich Ataxia: from its discovery to therapy. *Journal Of Neurochemistry*, 126, 1-3. doi: 10.1111/jnc.12327
- Seco-Cervera, M. (2017). *Identification of new biomarkers for phenotypical characterization in peripheral neuropathies* (Tesis doctoral inédita). Universitat de València, Valencia.
- Seco-Cervera, M., González-Rodríguez, D., Ibáñez-Cabellos, J. S., Peiró-Chova, L., González-Cabo, P., García-López, E., Vílchez, J. J., Sanz-Gallego, I., Pallardó, F. V., & García-Giménez, J. L. (2017). Circulating miR-323-3p is a biomarker for cardiomyopathy and an indicator of phenotypic variability in Friedreich's ataxia patients. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04996-9>
- Seibt, T., Proneth, B., & Conrad, M. (2019). Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication. *Free Radical Biology And Medicine*, 133, 144-152. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.014
- Seiler, A., Schneider, M., Förster, H., Roth, S., Wirth, E. K., Culmsee, C., Plesnila, N., Kremmer, E., Rådmark, O., Wurst, W., Bornkamm, G. W., Schweizer, U., & Conrad, M. (2008). Glutathione Peroxidase 4 Senses and Translates Oxidative Stress into 12/15-Lipoxygenase Dependent- and AIF-Mediated Cell Death. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.07.005>
- Shan, Y., Schoenfeld, R., Hayashi, G., Napoli, E., Akiyama, T., & Iodi Carstens, M. *et al.* (2013). Frataxin Deficiency Leads to Defects in Expression of Antioxidants and Nrf2 Expression in Dorsal Root Ganglia of the Friedreich's Ataxia YG8R Mouse Model. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(13), 1481-1493. doi: 10.1089/ars.2012.4537
- Sharma, R., De Biase, I., Gómez, M., Delatycki, M., Ashizawa, T., & Bidichandani, S. (2004).

- Friedreich ataxia in carriers of unstable borderline GAA triplet-repeat alleles. *Annals Of Neurology*, 56(6), 898-901. doi: 10.1002/ana.20333
- Sievers, C., Meira, M., Hoffmann, F., Fontoura, P., Kappos, L., & Lindberg, R. (2012). Altered microRNA expression in B lymphocytes in multiple sclerosis. *Clinical Immunology*, 144(1), 70-79. doi: 10.1016/j.clim.2012.04.002
- Sonntag K. C. (2010). MicroRNAs and deregulated gene expression networks in neurodegeneration. *Brain research*, 1338, 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.106>
- Sutak, R., Seguin, A., Garcia-Serres, R., Oddou, J., Dancis, A., & Tachezy, J. *et al.* (2012). Human mitochondrial ferritin improves respiratory function in yeast mutants deficient in iron-sulfur cluster biogenesis, but is not a functional homologue of yeast frataxin. *Microbiologyopen*, 1(2), 95-104. doi: 10.1002/mbo3.18
- Treiber, T., Treiber, N., & Meister, G. (2018). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(1), 5-20. doi: 10.1038/s41580-018-0059-1
- Tsou, A., Paulsen, E., Lagedrost, S., Perlman, S., Mathews, K., & Wilmot, G. *et al.* (2011). Mortality in Friedreich Ataxia. *Journal Of The Neurological Sciences*, 307(1-2), 46-49. doi: 10.1016/j.jns.2011.05.023
- van Rooij, E., & Olson, E. N. (2012). MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. *Nature reviews. Drug discovery*, 11(11), 860–872. <https://doi.org/10.1038/nrd3864>
- Vlachos, I. S., Zagganas, K., Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2015). DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic acids research*, 43(W1), W460–W466. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv403>

- Wong, A., Yang, J., Cavadini, P., Gellera, C., Lonnerdal, B., Taroni, F., & Cortopassi, G. (1999). The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. *Human Molecular Genetics*, 8(3), 425-430. doi: 10.1093/hmg/8.3.425
- Yandim, C., Natisvili, T., & Festenstein, R. (2013). Gene regulation and epigenetics in Friedreich's ataxia. *Journal Of Neurochemistry*, 126, 21-42. doi: 10.1111/jnc.12254
- Yang, W. S., Kim, K. J., Gaschler, M. M., Patel, M., Shchepinov, M. S., & Stockwell, B. R. (2016). Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603244113>
- Yuan, H., Li, X., Zhang, X., Kang, R., & Tang, D. (2016). Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.124>